

博士論文

トルラ酵母由来グルコシルセラミドのヒト皮膚状態の変化,

およびメラノーマ細胞におけるメラニン生成と

線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮に対する効果の検討

The study on the effect of torula yeast glucosylceramide on skin condition in
humans, and melanogenesis and collagen gel contraction in cells

2019年

福永 祥子

Shoko Fukunaga

目次

第1章 序論

1.1 トルラ酵母について	
1.1.1 トルラ酵母	1
1.1.2 トルラ酵母由来グルコシルセラミドの産業的有用性	1
1.2 スフィンゴ脂質について	2
1.2.1 スフィンゴ脂質	2
1.2.2 セラミド	3
1.2.3 グルコシルセラミド	4
1.3 皮膚の生理とグルコシルセラミド	5
1.3.1 皮膚の生理	5
1.3.2 グルコシルセラミドの皮膚細胞への効果	5
1.4 目的	6
参考文献	11

第2章 トルラ酵母グルコシルセラミド経口摂取のヒトの皮膚に与える影響

2.1 緒言	18
2.2 方法	19
2.2.1 対象者	19
2.2.2 トルラ酵母 GlcCer	19
2.2.3 研究デザイン	19
2.2.4 測定方法	20
2.2.5 統計解析	20
2.3 結果	21
2.3.1 TEWL	21
2.3.2 客観的皮膚状態の評価	21
2.3.3 主観的皮膚状態の評価	21
2.4 考察	22
2.5 結論	24
参考文献	28

第3章 トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母グルコシルセラミドのメラニン生成抑制, および植物抽出物との比較

3.1 緒言	31
--------	----

3.2	方法	32
3.2.1	試薬	32
3.2.2	細胞培養	32
3.2.3	メラニン量の測定	33
3.2.4	チロシナーゼ活性測定	33
3.2.5	フェオメラニン生成の抑制	34
3.2.6	TRP1 タンパク質発現 (ウェスタンブロッティング)	34
3.2.7	統計解析	35
3.3	結果	35
3.3.1	トルラ酵母抽出物および植物抽出物のメラニン生成およびチロシナーゼ活性の比較	35
3.3.2	トルラ酵母 GlcCer および植物, 菌類 GlcCer のメラニン生成およびチロシナーゼ活性の比較	36
3.3.3	GlcCer を除いたトルラ酵母抽出物 (GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物) のメラニン生成の作用機序	36
3.4	考察	37
3.5	結論	38
	参考文献	44
第4章 ヒト線維芽細胞におけるトルラ酵母抽出物の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響		
4.1	緒言	47
4.2	方法	47
4.2.1	試薬	47
4.2.2	細胞培養	48
4.2.3	細胞増殖 (MTT アッセイ)	48
4.2.4	I型コラーゲン産生量測定 (ELISA)	49
4.2.5	コラーゲン量測定	49
4.2.6	コラーゲングル収縮	49
4.2.7	統計解析	50
4.3	結果	50
4.3.1	ヒト真皮線維芽細胞におけるトルラ酵母抽出物の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響	50
4.3.2	ヒト真皮線維芽細胞におけるトルラ酵母 GlcCer の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響	50
4.4	考察	51

4.5 結論	52
参考文献	55
第5章 総括	58
参考文献	63
利益相反	66
謝辞	66
公表論文	67

第1章

序論

1.1 トルラ酵母について

1.1.1 トルラ酵母

トルラ酵母 (*Candida utilis*) は、キシロースなどの植物由来の糖を資化すること、好氣的培養条件下で高密度連続培養をすることが可能である[1]。それらの理由により、第一次世界大戦時にタンパク質源の確保を目的に、製造開発が進められた。そのため、トルラ酵母はヨーロッパでは食料として長い食経験があり安全であると考えられている[2]。また、The Food Chemical Codex と The Code of Federal Regulation in US には、トルラ酵母が食品として安全であることが記載されている[3, 4]。現在、本酵母は、そのエキスを抽出することでうまみ調味料として利用されているほか、システインペプチド (グルタチオン) などの健康食品素材としても利用されている[5]。

1.1.2 トルラ酵母由来グルコシルセラミドの産業的有用性

一般的なイノシトールホスホセラミドを含むパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やビール酵母 (*S. cerevisiae* と *S. pastorianus*) とは異なり、トルラ酵母はグルコシルセラミド (GlcCer) の原料となる[5, 6]。酵母の GlcCer の産生能力に違いがある理由として、高桑らは、パン酵母やビール酵母には、GlcCer 合成酵素が存在しないことを挙げている。本来有していた合成系が減弱し、分化する過程で欠落したと推察している[7]。しかしながら、酵母由来の GlcCer の研究報告は少なく、Mor らがトルラ酵母由来 GlcCer の機能性について報告しているが[8]、まだ十分に解明できていないといえない。

トルラ酵母以外の酵母由来 GlcCer が産業的にほぼ利用されていないのは、GlcCer を抽出・精製するためだけに酵母を培養すると製造コストが高くなるためである[5]。一方、既存のトルラ酵母製品の製造過程で出るトルラ酵母残渣は、年間数千トンにおよび、産業廃棄物と

して処理されている。農作物の中で GlcCer 含有量が多いとされているコムギで GlcCer 含有量が 0.02%である[9]のに対し、トルラ酵母残渣中の GlcCer 含有量は 0.15%と比較的高く、連続発酵システムにより農作物より品質変動の少ない原料が安定に供給でき、価格変動のリスクが少ない[10]。さらに、産業廃棄物であるトルラ酵母残渣からの GlcCer の抽出方法も確立されているため、低コストで製造ができる[10]。トルラ酵母残渣から抽出する GlcCer 含有物には、他の原料由来の GlcCer 含有素材より夾雑物が少ないことも特徴である[5, 10]。また、トルラ酵母由来 GlcCer は植物由来の GlcCer にはないスフィンゴイド骨格の 9 位にメチル基を有していることが構造的な特徴である (図 1.1) [11]。

1.2 スフィンゴ脂質について

1.2.1 スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質は、セラミドを基本構造とした脂質の総称である。動物由来のスフィンゴ脂質には、セラミドの他にスフィンゴミエリンが多く含まれており、植物性スフィンゴ脂質は大半が GlcCer である[12]。哺乳類由来のスフィンゴ脂質の主要スフィンゴイド骨格はスフィンゴシンであり[12]、植物および菌類由来のスフィンゴ脂質は哺乳類と比べて多様である[11, 13]。哺乳類由来スフィンゴ脂質のスフィンゴイド骨格の種類は、スフィンゴシン ($\text{trans-4-スフィンゲニン; d18:1}^{4t}$) の他にジヒドロスフィンゴシン (スフィンガニン; d18:0) とフィトスフィンゴシン (4-ヒドロキシスフィンガニン; t18:0) がある[13]。植物由来は哺乳類由来のものに加えて、 $\text{trans(cis)-8-スフィンゲニン (d18:1}^{8t}, \text{d18:1}^{8c})$ と $\text{trans-4, trans(cis)-8-スフィンガジエニン (d18:2}^{4t8t}, \text{d18:2}^{4t8c})$ 、4-ヒドロキシ- $\text{trans(cis)-8-スフィンゲニン (t18:1}^{8t}, \text{t18:1}^{8c})$ がスフィンゴイド骨格の種類として報告されている[13]。また、菌類由来は植物由来のものに 9-メチル- $\text{trans-4-trans-8-スフィンガジエニン (9-Me d18:2}^{4t8t})$ が加わる (図 1.2) [13]。

食事からのスフィンゴ脂質の摂取量は、アメリカ人では 1 日当たり全スフィンゴ脂質で

300-400 mg と算出されている[12]。また、日本人の場合は、自衛隊食 3 日分に含まれるスフィンゴ脂質を分析して 1 日当たりの摂取量を換算すると、1 日当たりスフィンゴミエリン 50-110 mg, GlcCer 60-80 mg を摂取していると報告されている[14]。また、植物から摂取している GlcCer は含有量から換算すると、1 日約 50 mg と見積もられる[9]。

1.2.2 セラミド

セラミドはスフィンゴ脂質の一種であり、スフィンゴイド骨格と脂肪酸が結合した構造である(図 1.3)。セラミドに糖およびホスホコリンが結合するとそれぞれグリコシルセラミド(糖セラミド; GlcCer やガラクトシルセラミドなど)およびスフィンゴミエリンと呼ばれる物質になる。これらの物質は一般的にセラミドと同じように美容作用を有することから、広義のセラミドとして化粧品や食品に使用されている。これらスフィンゴ脂質の発見は、1884 年に脳の構成成分として発表した J. L. W. Thudichum によるもので、彼はウシおよびヒトの脳抽出物のエタノール画分から数種類の糖セラミドを分離している[15, 16]。その後、分析技術の進歩につれてセラミドの様々な生理機能が研究されてきた。

ヒトに存在するセラミドの構造は 11 種と報告されている[17]。セラミドはヒト表皮角質層に存在する角質細胞間脂質の 50% を占める成分である[18]。表皮角質層中では、セラミドと水は層を成してラメラ構造を作り皮膚の保湿とバリア機能に寄与している[19, 20]。皮膚角質層のセラミド量は皮膚の老化やアトピー性皮膚炎患者において減少することが明らかとなっている[21]。セラミド、遊離脂肪酸、コレステロールは皮膚のバリア機能のための 3 つの重要な脂質とされている[22]。

また、セラミドの生理作用としてシグナル伝達に関連する働きがあり、糖代謝への影響[23]、アポトーシスのセカンドメッセンジャー[24]やそのアポトーシスを介したがん抑制作用[25]に関する研究報告がある。

1.2.3 グルコシルセラミド

GlcCer はコメ, コムギ, トウモロコシなど様々な植物性食品に含まれている[9]。これらの食品の GlcCer 高含有抽出物は化粧品などに利用されている[26-29]。しかしながら, これらの農作物に含まれる GlcCer はごく少量で, コムギで約 0.02%である[9]。先行研究において, 様々な原料由来の GlcCer はそれぞれ異なった化学構造を有することにより[13](図 1.4), 生理活性に違いがみられることが報告されている[30]。マウスメラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制試験において, 酵母, トウモロコシ, ウシの GlcCer では, 酵母とトウモロコシがウシ GlcCer と比べて有意にメラニン生成を抑制することが報告されている[30]。

セラミドは元々動物の脳から発見され抽出されたため[15], 化粧品へは従来動物由来のセラミドが利用されてきたが, 1990 年代に BSE 問題の影響により, 化粧品などの安全性の確保から植物や海洋生物が原料として用いられるようになった[31]。世界人口の増加に伴って化粧品用の植物原料の不足が予測されており, 原料の確保が課題となっている[32]。

食事性 GlcCer は, 皮膚の保湿[29]や弾力性[33]に寄与することや, がん[34]やアトピー性皮膚炎[35]を抑制することも報告されている。経口摂取した GlcCer は, 小腸管内でグルコシダーゼの作用によってセラミドとグルコースに分解され, セラミドはセラミダーゼの作用によってスフィンゴイド骨格と脂肪酸に分解される[12]。分解によって生じたスフィンゴイド骨格や脂肪酸は小腸上皮細胞に吸収されるが, その割合は脂肪酸で摂取量の 20-40%, スフィンゴイド骨格で数%と報告されている[36]。スフィンゴイド骨格および脂肪酸は小腸上皮細胞に吸収後, 一部は脂肪酸代謝に, 一部はスフィンゴ脂質に再利用され, リンパ管へ移行する[36]。植物由来スフィンゴ脂質も同様に消化されるが, 動物由来のもの比べると小腸上皮細胞から吸収されにくいことが報告されている[37-39]。スフィンゴ脂質の消化・吸収, 代謝については, まだ十分に解明されているとは言い難く, 現在も検証が行われている。

多くの報告において GlcCer などのスフィンゴ脂質の大半は, 吸収されずに大腸に達していることを報告している[38, 40-42]。大腸まで GlcCer などが達している点から, 大腸管腔内でのがん抑制[43]や腸内細菌叢改善[44]についても報告されている。

1.3 皮膚の生理とグルコシルセラミド

1.3.1 皮膚の生理

皮膚は、外側から表皮、真皮、皮下組織の3層から成る[45] (図 1.5)。表皮は外界からのバリア機能を有し、真皮は皮膚の弾力性の維持に寄与している[46]。表皮は外から順に角層、顆粒層、有棘層と基底層の4層から成り、体の部位によって厚さは異なるが、平均して50 μm の厚さである[47]。基底層の細胞間にメラノサイトがあり、基底層細胞4-10個に対して、メラノサイトが1個の割合で存在し、メラニン色素を産生することで紫外線から生体を防御している[45]。角層のバリア機能(水分保持)のため、顆粒層細胞内であるセラミドが作られ、コレステロール、脂肪酸とともに細胞外に放出され、角層の細胞間を埋めている[47]。一方、真皮は線維芽細胞により、コラーゲン線維、弾性線維などが生成され、コラーゲンは真皮のタンパク質の70%を占め[47]、コラーゲン線維は真皮線維の90%を占める[45]。健康な皮膚では、線維芽細胞はコラーゲン線維によって引っ張られ、緊張し、弾力性がある状態であるが、加齢した皮膚などではコラーゲン線維が切れ、線維芽細胞を引っ張ることができず、弾力性が失われている(図 1.6) [48]。

1.3.2 グルコシルセラミドの皮膚細胞への効果

健常人における先行試験では、1.8 mg/day のコメおよびコンニャク GlcCer をそれぞれ4 および8 週間の摂取することで、頬の皮膚においてバリア機能の指標である経皮水分蒸散量(transepidermal water loss; TEWL)の改善が認められた[27,47]。コムギ GlcCer は、1.6 mg/day の摂取によって15 日後に頬の TEWL を改善させ、60 日後まで摂取を継続しその効果が保たれたことが報告されている[50]。モモ GlcCer は、1.2 mg/day を20 日間摂取し前腕の TEWL の改善が認められた [51]。また、アトピー性皮膚炎患者における研究において、コンニャク GlcCer の1.8 mg/day の摂取で2 週間後に TEWL の改善が見られた[52]。他に、健常なヒトにビート GlcCer を1.8 mg/day、8 週間摂取させた研究において、皮膚の弾力性が向上したとする報告がある[33]。

動物においては、ヘアレスマウスを用いた評価系が多く使用されている。皮膚のバリア機能および保湿作用においては、コメやコンニャク GlcCer は、TEWL を改善したことが報告されている[29, 53]。TEWL の改善のメカニズムとして、コンニャク GlcCer の摂取により、ヘアレスマウスの皮膚のタイトジャンクションおよびコーニファイドエンベロープ関連の遺伝子発現の増加について報告されている[54]。コーニファイドエンベロープとは、表皮細胞が分化に伴い、細胞内に発現するタンパク質が架橋・修飾され、不溶化して形成される膜で、コーニファイドエンベロープを元に細胞間脂質が皮膚の保湿やバリア機能に寄与するラメラ構造が構築されるため、皮膚の状態に関連があると考えられている[55]。また、トウモロコシ GlcCer の摂取によって皮膚のセラミド合成酵素の遺伝子発現が増加したことが報告されている[28]。

細胞の研究では、コメ GlcCer は、ヒト表皮細胞中のセラミドおよび GlcCer の合成を促進することが報告されている[56]。その他、マウスメラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制作用が報告されており、GlcCer はチロシナーゼの抑制によってメラニン生成を抑制する[30]。

これらのことから、一般的に GlcCer には皮膚の保湿作用やバリア機能の改善作用およびメラニン生成抑制効果を有することが示唆される。

1.4 目的

皮膚はヒトの身体で最も外側に位置し、外界との接触が多い器官である。環境への曝露も多く、影響を受けやすい。環境曝露を避けるためのスキンケア用品の世界市場は、2002 年では日本円で約 880 億円に対し、2012 年では約 2 兆円であり、10 年間で 2.2 倍増加している[57]。

本論文では、トルラ酵母の既存製品の製造過程によるトルラ酵母残渣から抽出された GlcCer 含有トルラ酵母抽出物（トルラ酵母抽出物；GlcCer 濃度 34%）およびトルラ酵母由来 GlcCer（トルラ酵母 GlcCer；GlcCer 濃度 98%）を用いて、これまでに報告されているト

ルラ酵母以外の複数の GlcCer と比較し、その機能性を明らかにすることを目的とした。第 2 章では、トルラ酵母 GlcCer の経口摂取が皮膚に与える影響をヒト試験で検討した。そこから得られた知見をもとに細胞による生化学的実験により、第 3 章にマウスメラノーマ細胞を用いたトルラ酵母抽出物およびトルラ酵母 GlcCer のメラニン生成についての検討、第 4 章にヒト真皮線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮作用への影響について明らかにした。そして、トルラ酵母 GlcCer の皮膚保護効果について、ヒト試験で得られた結果の作用機序等を細胞実験の結果を踏まえて考察し、今後の産業的応用を目指す。

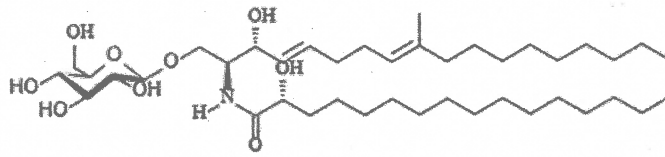


図 1.1 トルラ酵母由来 GlcCer の構造

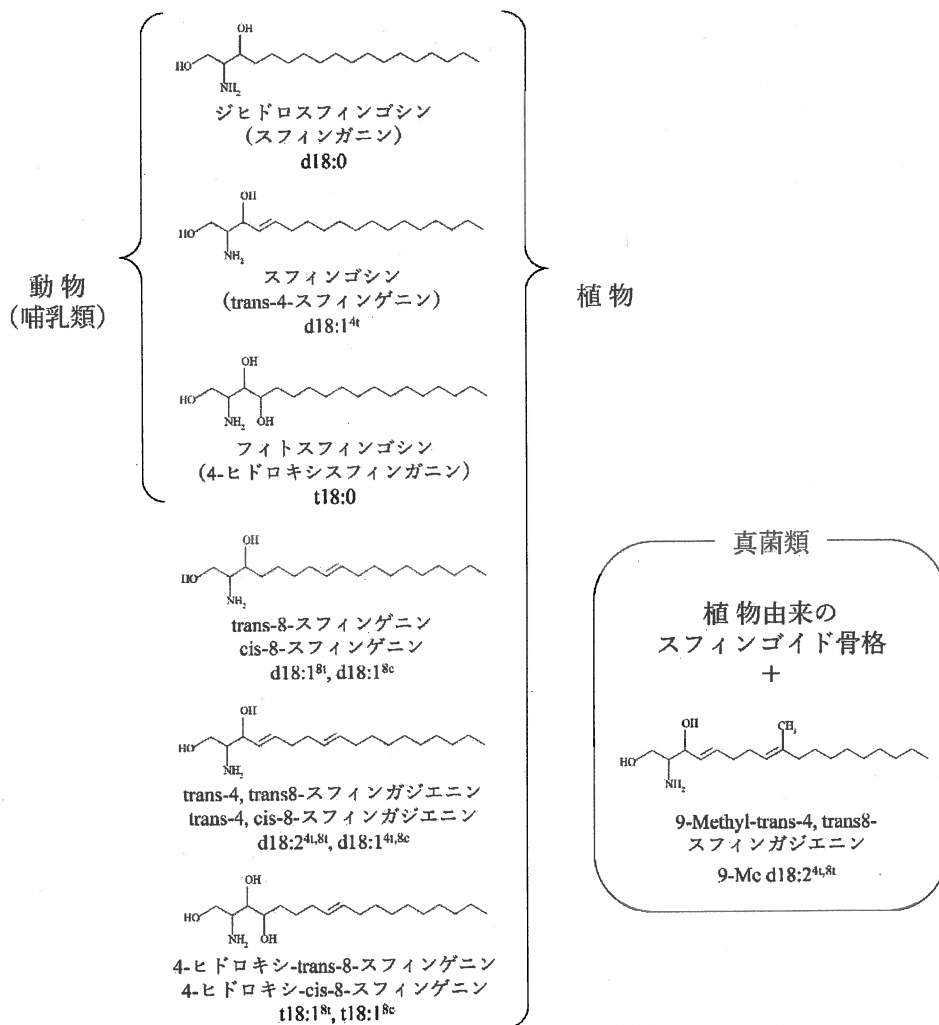


図 1.2 スフィンゴ脂質のスフィンゴイド骨格の種類

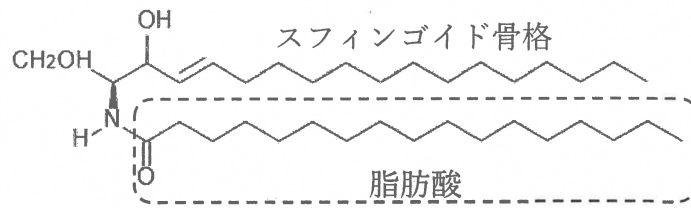


図 1.3 セラミドの基本構造

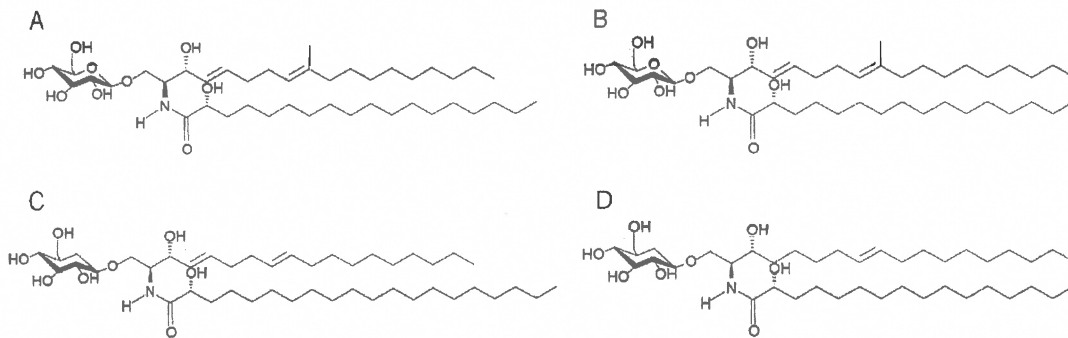


図 1.4 各種食品由来セラミドの主要な構成セラミドの構造図

A : トルラ酵母 (9-Me d18:2/18h:0) B : キノコ (9-Me d18:2/16h:0)

C : コメおよびトウモロコシ (d18:2/20h:0) D : コムギ (d18:1/16h:0)

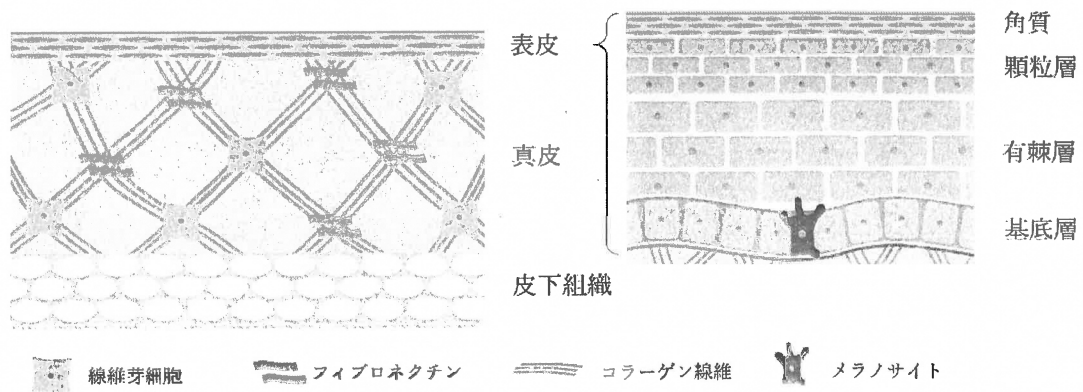


図 1.5 皮膚の構造

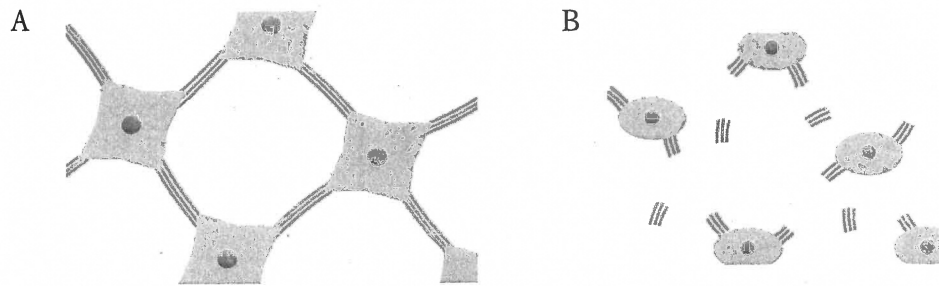


図 1.6 健康な皮膚と老化した皮膚の線維芽細胞の形態

A) 健康な皮膚の線維芽細胞とコラーゲン線維, B) 老化した皮膚の線維芽細胞とコラーゲン線維

Fisher GJ et al. (2008) を参考に作図

参考文献

1. 近藤恵二: 酵母 *Candida utilis* の異種遺伝子発現系. *化学と生物* 2000, **38**:614-620.
2. Weatherholtz W, Holsing G: **Acceptance of torula yeast for use as a food supplement.** *Ecology of Food and Nutrition* 1976, **5**:153-159.
3. Institute of Medicine and Codex Committee on Food Chemicals: **Monograph, Yeast, Dried.** *Food Chemicals Codex V.* Washington DC: National Academy Press; 2003, 508.
4. Food and Drug Administration Office of Federal Register (US): **Part 172 Food additives permitted for direct addition to food for human consumption, 172.896 Dried yeasts.** *The Code of Federal Regulations of the United States of America.* U.S. Government Printing Office; 2012, 121.
5. 梶直人, 佐藤寿哉, 中川智寛: 素材レポート トルラ酵母由来グルコシルセラミドの美容素材としての可能性. *食品と開発* 2014, **49**:52-54.
6. Saito K, Takakuwa N, Ohnishi M, Oda Y: **Presence of glucosylceramide in yeast and its relation to alkali tolerance of yeast.** *Applied microbiology and biotechnology* 2006, **71**:515-521.
7. 高桑直也: 酵母によるグルコシルセラミドの生合成とその利用. *化学と生物* 2008, **46**:108-114.
8. Mor V, Farnoud AM, Singh A, Rella A, Tanno H, Ishii K, Kawakami K, Sato T, Del Poeta M: **Glucosylceramide administration as a vaccination strategy in mouse models of cryptococcosis.** *PloS one* 2016, **11**:e0153853.
9. Sugawara T, Miyazawa T: **Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection.** *Lipids* 1999, **34**:1231.
10. Sato T, Nakagawa T, Kaji N: **Method for utilizing extraction residue of yeast extract.** United

- States Patent US 2014/0228305 A1. Inventors: KOHJIN Life Sciences Co., Ltd.; 2014.
11. Sperling P, Heinz E: **Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2003, **1632**:1-15.
 12. Vesper H, Schmelz E-M, Nikolova-Karakashian MN, Dillehay DL, Lynch DV, Merrill Jr AH: **Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition.** *The Journal of nutrition* 1999, **129**:1239-1250.
 13. 間和彦: **植物由来グルコシルセラミドの食品機能性評価とその応用.** *オレオサイエンス* 2007, **7**:141-149.
 14. Yunoki K, Ogawa T, Ono J, Miyashita R, Aida K, Oda Y, Ohnishi M: **Analysis of Sphingolipid Classes and Their Contents in Meals.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2008, **72**:222-225.
 15. Wennekes T, van den Berg RJ, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JM: **Glycosphingolipids — nature, function, and pharmacological modulation.** *Angewandte Chemie International Edition* 2009, **48**:8848-8869.
 16. Law BA, Hancock WD, Cowart LA: **Getting to the heart of the sphingolipid riddle.** *Current Opinion in Physiology* 2018, **1**:111-122.
 17. Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y: **Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function.** *Biochimie* 2009, **91**:784-790.
 18. Coderch L, López O, de la Maza A, Parra JL: **Ceramides and skin function.** *American journal of clinical dermatology* 2003, **4**:107-129.
 19. Imokawa G, Akasaki S, Hattori M, Yoshizuka N: **Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids.** *Journal of Investigative Dermatology* 1986, **87**:758-761.
 20. Imokawa G, Kuno H, Kawai M: **Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator.**

- Journal of investigative dermatology* 1990, **96**:845-851.
21. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A: **Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?** *Journal of Investigative Dermatology* 1991, **96**:523-526.
 22. Jungersted JM, Hellgren LI, Jemec GB, Agner T: **Lipids and skin barrier function—a clinical perspective.** *Contact dermatitis* 2008, **58**:255-262.
 23. Bikman BT, Summers SA: **Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism.** *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**:4222-4230.
 24. Hannun YA: **The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:3125-3128.
 25. Huang WC, Chen CL, Lin YS, Lin CF: **Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy.** *Journal of lipids* 2011, **2011**.
 26. Asai S, Miyachi H: **[Evaluation of skin-moisturizing effects of oral or percutaneous use of plant ceramides].** *Rinsho Byori* 2007, **55**:209-215.
 27. Bizot V, Godeu G, Guessous F, Latie E, Rousset G, Roch M, Hornebeck W: **Inhibition of human neutrophil elastase by wheat ceramides.** *International journal of cosmetic science* 1995, **17**:255-264.
 28. Duan J, Sugawara T, Hirose M, Aida K, Sakai S, Fujii A, Hirata T: **Dietary sphingolipids improve skin barrier functions via the upregulation of ceramide synthases in the epidermis.** *Experimental dermatology* 2012, **21**:448-452.
 29. Uchiyama T, Nakano Y, Ueda O, Mori H, Nakashima M, Noda A, Ishizaki C, Mizoguchi M: **Oral intake of glucosylceramide improves relatively higher level of transepidermal water loss in mice and healthy human subjects.** *Journal of Health Science* 2008, **54**:559-566.
 30. Kinoshita M, Hori N, Aida K, Sugawara T, Ohnishi M: **Prevention of melanin formation by yeast cerebroside in B16 mouse melanoma cells.** *Journal of oleo science* 2007, **56**:645-

648.

31. 菅沼薫: 感性を切り口にした消費者意識と化粧品トレンド. *日本化粧品技術者会誌* 2011, **45**:181-189.
32. 鈴木 高広: 化粧品の最近の市場動向と技術傾向 (特集 医薬品・化粧品製造における化学技術,粉体技術の役割). *化学装置* 2013, **55**:49-55.
33. Horii M, Kishimoto S, Tezuka Y, Nishigori H, Nomoto K, Hamada U, Yonei Y: **Double-blind study on effects of glucosyl ceramide in beet extract on skin elasticity and fibronectin production in human dermal fibroblasts.** *Anti-Aging Medicine* 2010, **7**:129-142.
34. Symolon H, Schmelz EM, Dillehay DL, Merrill Jr AH: **Dietary soy sphingolipids suppress tumorigenesis and gene expression in 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice and Apc Min/+ mice.** *The Journal of nutrition* 2004, **134**:1157-1161.
35. Ono J, Kinoshita M, Aida K, Tamura M, Ohnishi M: **Effects of dietary glucosylceramide on dermatitis in atopic dermatitis model mice.** *European journal of lipid science and technology* 2010, **112**:708-711.
36. Nilsson Å: **Metabolism of cerebroside in the intestinal tract of the rat.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1969, **187**:113-121.
37. Sugawara T, Kinoshita M, Ohnishi M, Nagata J, Saito M: **Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells.** *The Journal of nutrition* 2003, **133**:2777-2782.
38. 菅原達也: 食品機能性成分としてのスフィンゴ脂質の消化と吸収. *日本栄養・食糧学会誌* 2013, **66**:177-183.
39. Sugawara T, Tsuduki T, Yano S, Hirose M, Duan J, Aida K, Ikeda I, Hirata T: **Intestinal absorption of dietary maize glucosylceramide in lymphatic duct cannulated rats.** *Journal of lipid research* 2010, **51**:1761-1769.
40. Ishikawa J, Takada S, Hashizume K, Takagi Y, Hotta M, Masukawa Y, Kitahara T,

- Mizutani Y, Igarashi Y: **Dietary glucosylceramide is absorbed into the lymph and increases levels of epidermal sphingolipids.** *Journal of dermatological science* 2009, **56**:216-218.
41. Haruta-Ono Y, Setoguchi S, Ueno HM, Higurashi S, Ueda N, Kato K, Saito T, Matsunaga K, Takata J: **Orally administered sphingomyelin in bovine milk is incorporated into skin sphingolipids and is involved in the water-holding capacity of hairless mice.** *Journal of dermatological science* 2012, **68**:56-62.
42. Ueda O, Hasegawa M, Kitamura S: **Distribution in skin of ceramide after oral administration to rats.** *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2009, **24**:180-184.
43. Aida K, Kinoshita M, Tanji M, Sugawara T, Tamura M, Ono J, Ueno N, Ohnishi M: **Prevention of aberrant crypt foci formation by dietary maize and yeast cerebrosides in 1, 2-dimethylhydrazine-treated mice.** *Journal of Oleo Science* 2005, **54**:45-49.
44. Hamajima H, Matsunaga H, Fujikawa A, Sato T, Mitsutake S, Yanagita T, Nagao K, Nakayama J, Kitagaki H: **Japanese traditional dietary fungus koji *Aspergillus oryzae* functions as a prebiotic for *Blautia coccooides* through glycosylceramide: Japanese dietary fungus koji is a new prebiotic.** *SpringerPlus* 2016, **5**:1321.
45. Khavkin J, Ellis DA: **Aging skin: histology, physiology, and pathology.** *Facial Plastic Surgery Clinics* 2011, **19**:229-234.
46. Baumann L: **Skin ageing and its treatment.** *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 2007, **211**:241-251.
47. 市橋正光, 吉本聖, 安藤秀哉: **皮膚のアンチエイジング.** *オレオサイエンス* 2018, **18**:121-129.
48. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ: **Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications.** *Arch Dermatol* 2008, **144**:666-672.
49. 平河聡: **米胚芽エキス配合粉末顆粒の摂取による全身の皮膚バリア機能に対する改善効果.** *薬理と治療* 2013, **41**:1051-1059.

50. Bizot V, Cestone E, Michelotti A, Nobile V: **Improving Skin Hydration and Age-related Symptoms by Oral Administration of Wheat Glucosylceramides and Digalactosyl Diglycerides: A Human Clinical Study.** *Cosmetics* 2017, **4**:37.
51. Koikeda T, Tokudome Y, Okayasu M, Kobayashi Y, Kuroda K, Yamakawa J, Niu K, Masuda K, Saito M: **Effects of Peach (*Prunus persica*)-Derived Glucosylceramide on the Human Skin.** *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)* 2017, **17**:56-70.
52. Miyanishi K, Shiono N, Shirai H, Dombó M, Kimata H: **Reduction of transepidermal water loss by oral intake of glucosylceramides in patients with atopic eczema.** *Allergy* 2005, **60**:1454-1455.
53. Tsuji K, Mitsutake S, Ishikawa J, Takagi Y, Akiyama M, Shimizu H, Tomiyama T, Igarashi Y: **Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice.** *Journal of dermatological science* 2006, **44**:101-107.
54. Ideta R, Sakuta T, Nakano Y, Uchiyama T: **Orally Administered Glucosylceramide Improves the Skin Barrier Function by Upregulating Genes Associated with the Tight Junction and Cornified Envelope Formation.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2012, **76**:2012E2013-2012E2013.
55. 岡野由利: **スキンケア化粧品のコンセプトの変化.** *日本化粧品技術者会誌* 2016, **50**:91-97.
56. Shimoda H, Terazawa S, Hitoe S, Tanaka J, Nakamura S, Matsuda H, Yoshikawa M: **Changes in ceramides and glucosylceramides in mouse skin and human epidermal equivalents by rice-derived glucosylceramide.** *Journal of medicinal food* 2012, **15**:1064-1072.
57. Brandt FS, Cazzaniga A, Hann M: **Cosmeceuticals: current trends and market analysis.**

Semin Cutan Med Surg 2011, **30**:141-143.

第2章

トルラ酵母グルコシルセラミド経口摂取のヒトの皮膚に与える影響

2.1 緒言

動物実験においてコンニャク、コメ GlcCer の摂取によってマウスの皮膚のバリア機能や保湿の指標である TEWL の減少が報告されている[1, 2]。ヒト試験においても、コンニャク GlcCer 摂取による保湿作用が報告されている[2]。平成 27 年 4 月より機能性表示食品制度が始まり、個別審査の必要な特定保健用食品とは異なり個別審査がなく、事業者の責任の下、生鮮品も含む全ての食品への機能性の表示ができるようになった[3]。届出には、臨床研究または研究レビューによる関与成分等の機能性の科学的根拠が必要となる。皮膚の保湿作用の関与成分として、コメ、コンニャク、パイナップルなどの原料由来 GlcCer が現在 59 件の商品で登録されている[4]。また、GlcCer のヒト試験での科学的根拠が認められ、特定保健用食品の関与成分として 2019 年 4 月現在、1 商品について表示の許可が出ている。「本品に含まれる米胚芽由来のグルコシルセラミドは、肌の水分を逃しにくくするため、肌の乾燥が気になる方に適しています。」という表示が許可されている[5]。特定保健用食品への関与成分として表示の許可が出ていることから、科学的根拠となる研究が必要な分野である。

マウスを用いた動物実験において、GlcCer の摂取によって、皮膚のバリア機能に関わる表皮細胞のタイトジャンクションおよび、コーニファイドエンベロープ関連の遺伝子発現の増加が保湿作用のメカニズムとして報告されている[6]。さらに、表皮中のセラミド代謝酵素の遺伝子発現の減少および、セラミド合成酵素の遺伝子発現が増加することによる皮膚の保湿作用についても報告されている[7]。

そこで本研究では、健常人におけるトルラ酵母 GlcCer の経口摂取が皮膚細胞におよぼす影響を TEWL などの評価項目に基づいて検討した。

2.2 方法

2.2.1 対象者

試験期間は、2015年11月から2016年2月である。対象者は20歳以上の男女で、冬季に皮膚の荒れや乾燥を感じたことがある者である。インフォームドコンセントの後、17人の対象者（男性10人、女性7人；平均年齢 43.6 ± 10.3 歳）が登録された。以下の基準に当てはまる人は除外した。アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患を有する参加者、外来患者として薬物治療を受けている者、妊娠しているか、妊娠する予定がある、または母乳育児をしている者である。本研究は、京都府立大学倫理委員会の承認を得て実施された（承認番号：95, 2015）

2.2.2 トルラ酵母 GlcCer

トルラ酵母 GlcCer は興人ライフサイエンス株式会社（Tokyo, Japan）から提供された。GlcCer 濃度は90%である。1.8 mg のトルラ酵母 GlcCer をマツヤセルローズ白カプセル No.3（株式会社松屋, Osaka, Japan）に入れ、デキストリンでカプセルを満たすように調整した。プラセボにはカプセルの中身を全てデキストリンにしたものを用いた。カプセルの組成は表1に示した。

2.2.3 研究デザイン

対象者は、無作為に Group 1（男性5人、女性4人；平均年齢 40.9 ± 10.3 歳）と Group 2（男性5人、女性3人；平均年齢 46.8 ± 10.1 歳）に割り付けし、Group 1 はプラセボから GlcCer, Group 2 は GlcCer からプラセボの順に二重盲検クロスオーバー試験を行った（図4.1）。2条件の間には4週間のウォッシュアウト期間を設けた。ベースラインは試験開始時の1回目（11月）および wash-out 期間後の3回目（1月）の測定の数値を用いた。対象者はカプセル（1.8 mg のトルラ酵母 GlcCer もしくはプラセボ）を毎日1錠ずつ4週間摂取した。対象者には毎日、試験カプセルを摂取するのを忘れないようにメールを送った。各測定日には、医師の監督下、客観的な皮膚症状の指標である TEWL の測定、皮膚症状の質問票の記入、

血液サンプルの採取（一般生化学）を行った。試験期間1ヶ月前から試験終了までは、保湿効果のある化粧品の変更や機能性食品の使用は禁止した。

2.2.4 測定方法

測定中は、部屋の温度および湿度はそれぞれ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $50 \pm 10\%$ に保った。対象者は測定の前30分前に、水分損失状態を統一する為にジャケットを脱ぎ、Tシャツを着て座位の状態に安静にした。TEWL は Tewameter TM300 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany) を用いて、説明書に従って測定した[8, 9]。20秒間の測定で最も一定した数値から平均値を算出した。測定場所は、右肘から手首に向かって10 cm (前腕)、右耳たぶから右口角を結ぶ線上の頬で耳たぶから3 cm (頬) の所であった。

客観的な皮膚状態は、VISIA® Evolution (Canfield Scientific, Fairfield, NJ, USA) [10-12] を用いて測定した。0から5までの6ポイントのスケールで、低い点ほど好ましい皮膚状態を示す。本研究では以下の項目について評価した。一般的な色素沈着の斑点、紫外線による深い色素沈着の斑点、褐色斑点の表面メラニン、赤い部分の表面ヘモグロビン、にきびの危険性を示すアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の代謝産物であるポルフィリン、色調と質感、シワの長さである。正面での測定より側面からの測定の方が容易な為、顔の右側の測定をVISIAで行った。

主観的な皮膚状態を評価するために用いたアンケートは、肌の硬さ、つや、乾燥、かゆみ、肌荒れ、シワ、しみ、くすみ、化粧のしやすさ (女性のみ)、全体的な皮膚の健康について対象者に尋ねた。回答は、visual analog scale (VAS) に基づいて評価された。0が最も悪く、10が最も良い皮膚状態を示す。他の症状は自由記述によって評価した。

2.2.5 統計解析

すべての数値は平均値±標準誤差で示した。データ解析には SPSS ver.22 (IBM, Tokyo) を用い、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。対応のあるt検定は、各群 (プラセボと GlcCer) の撮

取前後比較と群間の差を比較するために使用した。TEWL と皮膚状態の主観的評価の解析は、冬季の皮膚のたるみと乾燥があると感じている対象者のみで行った。すべての対象者が客観的な皮膚状態の評価を受けた。

2.3 結果

2.3.1 TEWL

前腕の TEWL は、摂取前と比較して GlcCer の摂取後に有意に減少した ($p = 0.02$, 表 2, 図 4.2)。前腕の試験期間にわたる TEWL の変化量は、プラセボ群および GlcCer 群でそれぞれ 0.97 ± 0.48 および $-1.26 \pm 0.46 \text{ g/m}^2 \cdot \text{h}$ で、GlcCer 群の TEWL は有意に低かった ($p = 0.01$, 表 2)。

2.3.2 客観的皮膚状態の評価

プラセボ群と GlcCer 群間の客観的皮膚状態のベースライン比較は、褐色斑点に関して GlcCer 群で有意に高値であった ($p = 0.05$, 表 2)。摂取前後の褐色斑点のスコアの変化量は、プラセボ群および GlcCer 群でそれぞれ 0.01 ± 0.01 および -0.01 ± 0.01 ポイントであった。プラセボ群で増加したが、GlcCer 群では減少し、変化量を比較すると GlcCer 群が有意に低かった ($p = 0.04$, 表 2)。群間および各群の試験前後で比較したとき、他の項目において有意な差はみられなかった (表 2)。

2.3.3 主観的皮膚状態の評価

プラセボと GlcCer の群間での主観的な皮膚状態におけるベースラインでの比較は、全ての評価項目において有意な差はなかった (表 3)。皮膚の荒れにおいて、スコアの変化量はプラセボと GlcCer でそれぞれ -1.36 ± 0.63 と 0.55 ± 0.53 ポイントであった。皮膚の荒れはプラセボ群では悪化した、GlcCer 群では改善し、両群の変化量を比較すると GlcCer 群が高

値であった ($p=0.04$, 表3)。群間および各群の試験前後で比較して、他の項目において有意な差はみられなかった。また、対象者が訴えた自覚症状はなかった。

2.4 考察

本研究では、4週間のトルラ酵母 GlcCer 1.8 mg/日の摂取によって、バリア機能を示す前腕の TEWL の減少、メラニン生成抑制を示す褐色斑点のスコアの改善、および肌荒れの自覚症状悪化抑制傾向の3つの結果がみられた。

対象者にコンニャク抽出物 (GlcCer 当量: 1日当たり 1.8 mg) もしくはプラセボを摂取させた先行研究では、頬の TEWL はプラセボと比較して 8 週間摂取後および 12 週間摂取後に有意に減少した。対照的に、前腕の TEWL は有意な差はみられなかった[2]。乾燥肌の先行研究では、遊離セラミド含有酢酸菌 (セラミド当量: 1日当たり 400 および 800 μg) の4週間摂取により、プラセボ群と比較して頬の TEWL が上昇することを示した。しかしながら、6週間の摂取後、セラミド群の TEWL はベースラインより有意に低下した[13]。別の先行研究では、毎日のビート抽出物 (GlcCer 当量: 1日当たり 0.6 と 1.8 mg) の摂取は、4および8週間後の腕および頬の両方の TEWL に有意な影響を及ぼさなかった。さらに、メラニン量と紅斑にも影響を及ぼさなかった[14]。

本研究と先行研究の GlcCer (セラミド) 群の頬の TEWL の平均ベースライン値は、トルラ酵母 (本研究)、コンニャク、酢酸菌、ビートでそれぞれ 14.1, 26.3, 21.4, 22.2 $\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$ で、前腕の TEWL の平均ベースライン値は、同様にそれぞれ 9.3, 7.6, 8.3, 7.2 $\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$ であった。先行研究と比較して、本研究ではベースライン時の頬の TEWL が低く、前腕は高かった。これらのことが、頬では改善が見られず前腕では改善が見られた原因と推察した。褐色斑点の変化量は、プラセボ群と比較して GlcCer 群は有意に低値を示した。2群間のベースラインの差 (プラセボ群: 0.44, GlcCer 群: 0.46, $p=0.05$, 表2) がこの結果に影響を及ぼした可能性がある。先行研究において、種類は違うが GlcCer の構造は同じである酵母

(*Saccharomyces kluyveri*) GlcCer の細胞実験によるメラニン生成抑制が報告されており[15], 本研究は先行研究の結果をヒト試験にて支持することとなった。

さらに、シワの客観的評価に関して、統計的に有意ではないが、前後の変化量がプラセボ群よりも GlcCer 群で抑制される傾向であった ($p = 0.10$)。シワは、真皮中のコラーゲンおよび角質層のセラミドの加齢に伴う減少から生じる[16]。植物 GlcCer の摂取によって、マウス表皮のセラミド合成酵素の遺伝子発現の増加[7]や、ヒトの皮膚弾力性の向上[14]などが報告されており、トルラ酵母 GlcCer の抗シワ作用が期待できる。

主観的評価の肌荒れの有意な改善が、プラセボ群と比較して GlcCer 群で認められた。肌荒れの主観的症状はベースラインで 5.15 ポイントとほぼ中間値であったため、GlcCer の効果が示されやすかったことが考えられる。肌荒れによって、皮膚のバリア機能と保湿機能が低下し、ストレスによる抵抗性が低下するため、バリア機能と保湿機能の維持改善修復が重要である[17]。本研究では、TEWL の改善によって、肌荒れの自覚症状も改善した可能性がある。

日本人が植物性食品からの GlcCer の摂取量は、推定で 50 mg とされている[18]。一方、本研究では、1 日わずか 1.8 mg のトルラ酵母 GlcCer 摂取を 4 週間継続することで TEWL の改善が認められた。Uchiyama らは、1 日当たりの GlcCer 摂取量が同じ 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ の動物実験において、GlcCer 含有コンニャク抽出物 (GlcCer 濃度 12%) 摂取群とコンニャク GlcCer (GlcCer 濃度 100%) 摂取群と比較するとコンニャク GlcCer でのみ保湿効果があったことを報告している[2]。植物由来スフィンゴイド骨格は、Caco-2 細胞を用いた実験において、薬物排出トランスポーターである P-糖タンパク質によって細胞外に排出されることが報告されている[19, 20]。ラットにおける動物実験においても P-糖タンパク質がスフィンゴイド骨格の吸収において関係していることが報告されている[21]。また、ラットにおける実験では、トウモロコシ GlcCer を経口投与後、リンパ液の糖セラミドが上昇したことが報告されている[22]。放射性同位体でスフィンゴイド骨格にラベル化した GlcCer を摂食させ、リンパ液を回収すると、ラベル化された糖セラミドが測定できたことが報告されている[23]。摂

食した GlcCer は消化管内で消化された後、少なくとも一部は吸収され、糖セラミドに再合成されることが推察される。これらの報告から、食品や抽出物中に GlcCer の吸収率を低下させる、または再合成を阻害する成分を含有している可能性が考えられる。

しかしながら、消化・吸収、再合成の構造による違いなど、GlcCer の生体内動態については十分な報告がなく、さらなる研究が必要である。

2.5 結論

本研究は、ヒトにおけるトルラ酵母 GlcCer の摂取が TEWL を改善し、メラニン生成を示す褐色斑点の悪化を抑制する可能性を示した。トルラ酵母 GlcCer の経口摂取は、皮膚状態を改善させることが期待できる。

表 1 プラセボおよび GlcCer 群の試験カプセルの組成

Composition	Placebo	GlcCer
Capsule (mg)	50.0	50.0
Dextrin (mg)	130.0	128.2
Trula yeast-derived glucosylceramide (mg)	-	1.8

GlcCer: Glucosylceramide

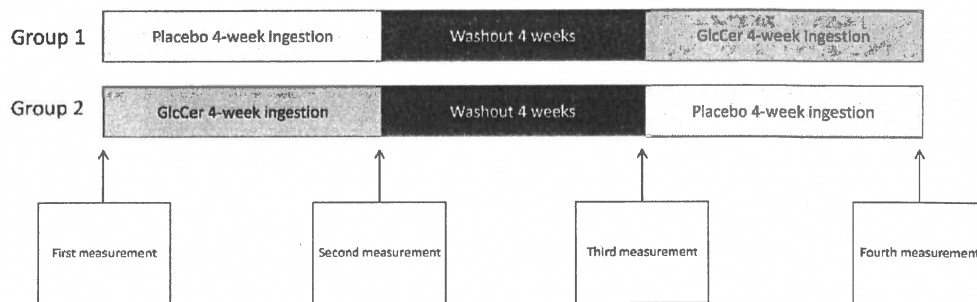


図 2.1 研究デザイン

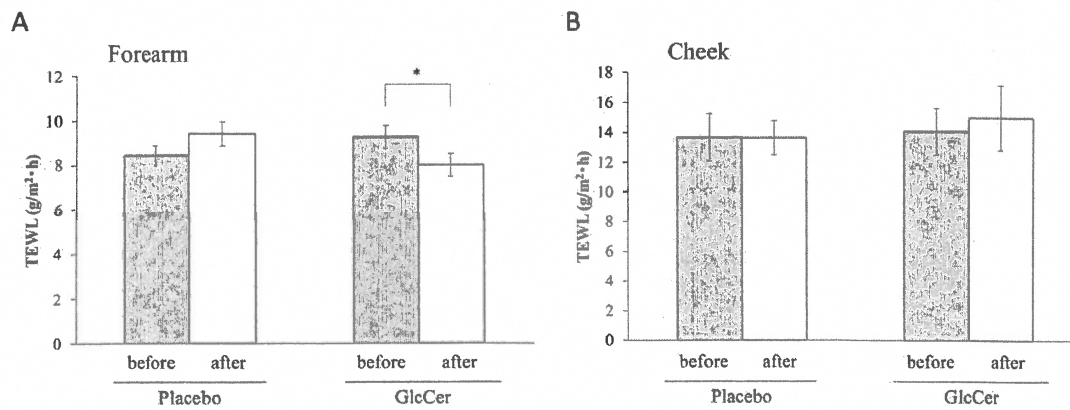


図 2.2 試験期間前後の経皮水分蒸散量 (TEWL) の比較

A) 前腕, B) 頬

表2 プラセボおよびGlcCer摂取前後のTEWL (g/m²·h) と客観的な皮膚状態

	n	Placebo			GlcCer						
		Before	After	Difference	p value ^a	Before	After	Difference	p value ^a	p value ^b	p value ^c
Trans epidermal water loss rates (g/m ² ·h)											
Forearm	12	8.47 ± 0.45	9.44 ± 0.55	0.97 ± 0.48	0.08	9.29 ± 0.51	8.03 ± 0.52	-1.26 ± 0.46	0.02 *	0.06	0.01 *
Cheek	12	13.68 ± 1.59	13.64 ± 1.15	-0.04 ± 0.88	0.96	14.08 ± 1.57	15.00 ± 2.18	0.92 ± 1.14	0.46	0.83	0.61
Objective skin conditions											
Brown spots	16	0.44 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.07	0.46 ± 0.02	0.45 ± 0.02	-0.01 ± 0.01	0.18	0.05 *	0.04 *
Porphyryn	16	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.59	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	-0.01 ± 0.00	0.09	0.81	0.34
Red areas	16	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.24	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.86	0.96	0.63
Spots	17	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.03	-0.01 ± 0.00	0.29	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.00 ± 0.01	0.85	0.79	0.66
Texture	17	0.15 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.20	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.32	0.60	0.89
UV Spots	17	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.00 ± 0.01	0.88	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.19	0.71	0.27
Wrinkles	17	0.11 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.04 ± 0.02	0.03	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.66	0.24	0.10

mean ± standard error

GlcCer: Glucosylceramide

^a Paired t-test comparing before and after ingestion in the groups.

^b Paired t-test comparing between the placebo and GlcCer groups in the baseline.

^c Paired t-test comparing difference before and after ingestion in the placebo and GlcCer groups.

* $p < 0.05$

表3 プラセボおよびGlcCer摂取前後の主観的な皮膚状態

Subjective skin conditions	n	Placebo			GlcCer			P value ^b	P value ^c		
		Before	After	Difference	p value ^a	Before	After			Difference	p value ^a
Firmness	12	4.33 ± 0.48	4.62 ± 0.41	0.29 ± 0.31	0.39	4.65 ± 0.47	5.11 ± 0.40	0.46 ± 0.43	0.33	0.399	0.79
Luster	12	4.23 ± 0.43	4.48 ± 0.42	0.25 ± 0.33	0.48	4.38 ± 0.38	4.73 ± 0.35	0.36 ± 0.48	0.49	0.756	0.86
Dryness	12	3.61 ± 0.39	3.33 ± 0.32	-0.27 ± 0.53	0.63	4.04 ± 0.36	4.32 ± 0.34	0.28 ± 0.59	0.66	0.425	0.45
Itchiness	12	7.32 ± 0.70	6.77 ± 0.82	-0.54 ± 0.76	0.51	7.58 ± 0.76	6.80 ± 0.72	-0.78 ± 0.61	0.25	0.672	0.83
Chapped skin	12	5.98 ± 0.51	4.62 ± 0.59	-1.36 ± 0.63	0.06	5.13 ± 0.51	5.69 ± 0.53	0.55 ± 0.57	0.37	0.273	0.04 *
Tautness	12	4.83 ± 0.79	3.76 ± 0.51	-1.08 ± 0.87	0.26	5.15 ± 0.62	4.61 ± 0.55	-0.54 ± 0.55	0.37	0.419	0.52
Blemishes, dullness	12	4.83 ± 0.67	4.35 ± 0.42	-0.48 ± 0.59	0.45	4.60 ± 0.60	5.38 ± 0.49	0.33 ± 0.53	0.20	0.742	0.36
Ease of cosmetic application	6	5.05 ± 0.18	4.80 ± 0.31	-0.13 ± 0.20	0.59	5.62 ± 0.60	5.36 ± 0.52	-0.13 ± 0.09	0.23	0.409	0.99
Overall skin health	12	5.14 ± 0.50	4.50 ± 0.42	-0.65 ± 0.61	0.34	5.23 ± 0.36	5.15 ± 0.42	-0.08 ± 0.37	0.84	0.842	0.44

mean ± standard error

GlcCer: Glucosylceramide

^a Paired t-test comparing before and after ingestion in the groups.

^b Paired t-test comparing between the placebo and GlcCer groups in the baseline.

^c Paired t-test comparing difference before and after ingestion in the placebo and GlcCer groups.

* $p < 0.05$

参考文献

1. Shimoda H, Terazawa S, Hitoe S, Tanaka J, Nakamura S, Matsuda H, Yoshikawa M: **Changes in ceramides and glucosylceramides in mouse skin and human epidermal equivalents by rice-derived glucosylceramide.** *Journal of medicinal food* 2012, **15**:1064-1072.
2. Uchiyama T, Nakano Y, Ueda O, Mori H, Nakashima M, Noda A, Ishizaki C, Mizoguchi M: **Oral intake of glucosylceramide improves relatively higher level of transepidermal water loss in mice and healthy human subjects.** *Journal of Health Science* 2008, **54**:559-566.
3. 消費者庁: **食品関連事業者の方へ 「機能性表示食品」制度がはじまります!**
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/about_foods_with_function_claims/pdf/150810_2.pdf (2019年6月24日)
4. 消費者庁: **機能性表示食品制度届出データベース**
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/
(2019年6月24日)
5. 消費者庁: **特定保健用食品許可(承認)一覧**
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/health_promotion/#m02
(2019年6月24日)
6. Ideta R, Sakuta T, Nakano Y, Uchiyama T: **Orally Administered Glucosylceramide Improves the Skin Barrier Function by Upregulating Genes Associated with the Tight Junction and Cornified Envelope Formation.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2012, **76**:2012E2013-2012E2013.
7. Duan J, Sugawara T, Hirose M, Aida K, Sakai S, Fujii A, Hirata T: **Dietary sphingolipids improve skin barrier functions via the upregulation of ceramide synthases in the epidermis.** *Experimental dermatology* 2012, **21**:448-452.

8. Pinnagoda J, Tupkek R, Agner T, Serup J: **Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement: a report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis.** *Contact dermatitis* 1990, **22**:164-178.
9. Rogiers V: **EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences.** *Skin Pharmacology and Physiology* 2001, **14**:117-128.
10. Yonei Y, Ashigai H, Ogura M, Yagi M, Kawachi Y, Yanai T: **Effect of consumption of a cassis polysaccharide-containing drink on skin function: a double blind randomized controlled trial of 9-week treatment.** *group* 2012, **6**:0.13.
11. Yu CS, Yeung CK, Shek SY, Tse RK, Kono T, Chan HH: **Combined infrared light and bipolar radiofrequency for skin tightening in Asians.** *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery* 2007, **39**:471-475.
12. Janjua R, Munoz C, Gorell E, Rehmus W, Egbert B, Kern D, Chang ALS: **A two - year, double - blind, randomized placebo - controlled trial of oral green tea polyphenols on the long - term clinical and histologic appearance of photoaging skin.** *Dermatologic Surgery* 2009, **35**:1057-1065.
13. Oda T, Tachimoto H, Kishi M, Kaga T, Ichihashi M: **Effect of Oral Intake of Ceramide-Containing Acetic Acid Bacteria on Skin Barrier Function.** *Anti-Aging Medicine* 2010, **7**:50-54.
14. Hori M, Kishimoto S, Tezuka Y, Nishigori H, Nomoto K, Hamada U, Yonei Y: **Double-blind study on effects of glucosyl ceramide in beet extract on skin elasticity and fibronectin production in human dermal fibroblasts.** *Anti-Aging Medicine* 2010, **7**:129-142.
15. Kinoshita M, Hori N, Aida K, Sugawara T, Ohnishi M: **Prevention of melanin formation by yeast cerebroside in B16 mouse melanoma cells.** *Journal of oleo science* 2007, **56**:645-648.

16. Both DM, Goodtzova K, Yarosh DB, Brown DA: **Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells.** *Archives of dermatological research* 2002, **293**:569-575.
17. 福田實: **皮膚科学と化粧品.** *色材協会誌* 2001, **74**:308-316.
18. Sugawara T, Miyazawa T: **Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection.** *Lipids* 1999, **34**:1231.
19. Sugawara T, Kinoshita M, Ohnishi M, Tsuzuki T, Miyazawa T, Nagata J, Hirata T, Saito M: **Efflux of sphingoid bases by P-glycoprotein in human intestinal Caco-2 cells.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2004, **68**:2541-2546.
20. 菅原達也: **食品機能性成分としてのスフィンゴ脂質の消化と吸収.** *日本栄養・食糧学会誌* 2013, **66**:177-183.
21. Fujii A, Manabe Y, Aida K, Tsuduki T, Hirata T, Sugawara T: **Selective Absorption of Dietary Sphingoid Bases from the Intestine via Efflux by P-Glycoprotein in Rats.** *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2017, **63**:44-50.
22. Ishikawa J, Takada S, Hashizume K, Takagi Y, Hotta M, Masukawa Y, Kitahara T, Mizutani Y, Igarashi Y: **Dietary glucosylceramide is absorbed into the lymph and increases levels of epidermal sphingolipids.** *Journal of dermatological science* 2009, **56**:216-218.
23. Nilsson Å: **Metabolism of cerebroside in the intestinal tract of the rat.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1969, **187**:113-121.

第3章

トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母グルコシルセラミドのメラニン生成抑制, および植物抽出物との比較

3.1 緒言

メラニンとは紫外線刺激によってメラノゾームでチロシンからチロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質1と2 (tyrosinase-related protein 1,2) の主に3つの酵素により産生される[1] (図3.5)。メラニンには、黄色のフェオメラニンと黒色のユーメラニンの2種類がある[2]。チロシンはチロシナーゼによってDOPAキノンに変換し、システインやグルタチオンの存在下ではフェオメラニンに変換され、非存在下ではユーメラニンに変換される[3]。

メラニン生成は紫外線刺激に対する生体の防御反応であり [4, 5], その結果, 皮膚にしみやそばかすといった褐色斑点が生じる[6, 7]。既存の多くのメラニン生成抑制剤がチロシナーゼ活性の阻害によるものである[8]。しかし, メラノゾームからのメラニン輸送の阻害やチロシナーゼタンパク質の発現抑制などの機序も報告されている[9, 10]。

セラミドのメラニン生成抑制作用の機序として, チロシナーゼの mRNA 発現阻害によるタンパク質発現抑制が報告されている[3]。また, チロシナーゼ発現に関わる *microphthalmia associated transcription factor* (MITF) のタンパク質発現の抑制についても報告されている[11, 12]。ウシ, 酵母, またはトウモロコシの原料によって, メラニン生成への作用の違いも報告されている[13]。

本研究では, メラニン生成に対するトルラ酵母抽出物とトルラ酵母 GlcCer のメラニン生成抑制の作用機序を明らかにすることを目的とした。さらに, GlcCer 含有植物抽出物と植物由来 GlcCer の効果を比較した。

3.2 方法

3.2.1 試薬

コメおよびトウモロコシ抽出物は日本製粉株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。トルラ酵母抽出物および GlcCer を除去したトルラ酵母抽出物 (GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物) は興人ライフサイエンス株式会社より提供を受けた。GlcCer 含有食品抽出物の GlcCer 含有率は、コメ抽出物が 6%、トウモロコシ抽出物が 3%、トルラ酵母抽出物が 34% である。キノコ、コメ、コムギ、トウモロコシ GlcCer は長良サイエンス株式会社 (Gihu, Japan) より購入した。トルラ酵母 GlcCer は興人ライフサイエンス株式会社より提供された。キノコ (主な GlcCer 構造: 9-Me d18:2/16h:0)、コメ (d18:2/20h:0)、コムギ (d18:1/16h:0)、トウモロコシ (d18:2/20h:0)、トルラ酵母 GlcCer (9-Me d18:2/18h:0) GlcCer は純度 98% 以上である [14, 15]。Dulbecco's modified Eagle 培地 (DMEM) とウシ胎仔血清 (FBS) は Life Technologies (Carlsbad, CA) と JR Scientific (Woodland, CA) から購入した。トリプシン、乳酸ナトリウム、Triton X-100、N-エチルマレイミド (NEM) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。エタノール、合成メラニン は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。水酸化ナトリウム、phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)、L-beta-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) はそれぞれ、純正化学株式会社 (Tokyo, Japan)、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)、MP Biomedicals, LLC (Santa Ana, CA) より購入した。TRP1, anti-goat IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より購入した、 β -actin 抗体は NeoMarkers (Fremont, CA) より、anti-mouse IgG は Cell Signaling Technology (Danvers, MA) より購入した。

3.2.2 細胞培養

B16 マウスメラノーマ細胞は理研遺伝子バンク (Saitama, Japan) より購入し、5% FBS-DMEM 培地にて 37°C、二酸化炭素濃度 5% にて培養した。メラニン生成、チロシナーゼ活性の実験では、トルラ酵母抽出物は最終濃度 1-25 μ g GlcCer eq./ml で、トルラ酵母 GlcCer は最終濃度 10 μ g/ml で培地に添加し、細胞を 6 日間培養した。植物抽出物と植物 GlcCer はそ

れぞれ 5 μg GlcCer eq./ml と 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で培地に添加し、細胞を 6 日間培養した。トルラ酵母および植物の抽出物と GlcCer は実験に用いる前にエタノールに溶解させた。

GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物の実験では、GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物をエタノールに溶解後、最終濃度 1-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になる様に培地に添加して、細胞を 6 日間培養した。なお、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物は 0.85 μg GlcCer eq./ml の酵母抽出物に相当する。

3.2.3 メラニン量の測定

細胞をトリプシン処理にてプラスチックプレートから剥離し、PBS で 2 回洗浄した。先行研究に準じて PBS を取り除いた細胞ペレットを 1 N NaOH で 100°C、10 分間加熱・溶解した[13, 16]。細胞溶液を 405 nm で吸光度測定し、合成メラニン量の検量線からメラニン量を算出した。タンパク質量は BCA タンパク質測定キット (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて製造元の説明書に準じて測定した。既知のチロシナーゼ阻害剤として、50 mM 乳酸ナトリウムをメラニン生成抑制のポジティブコントロール (P.C.) として使用した[17, 18]。乳酸ナトリウムを細胞培養培地に最終濃度が 50 mM になる様に溶解し、フィルター滅菌をした後、細胞培養に用いた。メラニン量はタンパク質量 (mg) 当たりの重量 (mg) で求め、コントロール (GlcCer 不添加) に対する百分率で示した (メラニン生成率; % of control)。また、メラニン生成抑制率 (%) は 100 - メラニン生成率 (% of control) とした。

3.2.4 チロシナーゼ活性測定

細胞をトリプシン処理にてプラスチックプレートより剥がし、一定細胞数をチロシナーゼ活性測定用に分け、PBS にて 2 回洗浄した。PBS を取り除いた細胞ペレットに 1% Triton X-100 と 0.1 mM PMSF を含んだ 50 mM PBS を加えてホモジナイズした。遠心分離後、上清を 10 mM L-DOPA と混和させ、直ちに 475 nm の吸光度を測定し始めた。L-DOPA を加えて

から3時間、37°Cで加温しながら吸光度を経時測定した[16]。乳酸ナトリウム (50 mM) はチロシナーゼ活性阻害のポジティブコントロールとして使用した[17, 18]。チロシナーゼ活性は、コントロールに対する百分率として示した (チロシナーゼ活性率; % of control)。また、チロシナーゼ活性阻害率 (%) は $100 - \text{チロシナーゼ活性率 (\% of control)}$ とした。

3.2.5 フェオメラニン生成の抑制

フェオメラニン生成の測定実験では、細胞は 1 μM の NEM と共存下に GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物 (10 $\mu\text{g/ml}$) を培地に添加して培養した。トルラ酵母抽出物のメラニン生成抑制作用は、メラニン生成がユーメラニンからフェオメラニンにシフトしたことによるものではないかと仮定し、細胞培養培地に 1 μM NEM を添加し、NEM を細胞内のチオール基に結合させることでフェオメラニン生成を遮断した[19]。

3.2.6 TRP1 タンパク質発現 (ウェスタンブロッティング)

TRP1 のタンパク質発現をウェスタンブロッティングにて評価するため、細胞は GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物 (1 - 10 $\mu\text{g/ml}$) を添加した培地で6日間培養した。GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物を添加した培地で6日間培養した B16 マウスメラノーマ細胞を PBS で2回洗浄し、1 mM PMSF を含んだ細胞抽出液で細胞を抽出した。細胞抽出液はタンパク質濃度が 10 $\mu\text{g/lane}$ になる様に希釈し、12% SDS-PAGE にて電気泳動した後、Poly Vinylidene Difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルク-0.05% Tween-20 PBS 溶液 (PBST) でブロッキングした。PBST で洗浄後、PVDF 膜は一次抗体 (TRP1 抗体 (1:200), β -actin (1:10,000)) で 4°C, 一晩の反応をさせた。それから、PVDF 膜を PBST で洗浄して、二次抗体で室温、1時間の反応をさせた。PBST で洗浄後、ECL ウェスタンブロッティング検出液を用い、バンドの検出を ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, England) で行った。解析は Image J ver.1.2 software (NIH, Bethesda, MD) で行った。

3.2.7 統計解析

統計解析はエクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。データは Kruskal-Wallis 検定の後, 用量依存性の検定には Shirley-Williams, 群間比較には Steel-Dwass の多重比較検定により有意差を求めた。結果は平均値±標準偏差 (SD) で示した。すべての結果は $p < 0.05$ を統計学的有意とし, Shirley-Williams の多重比較の有意差は $p < 0.05$ で表記した。

3.3 結果

3.3.1 トルラ酵母抽出物および植物抽出物のメラニン生成およびチロシナーゼ活性の比較

トルラ酵母抽出物は, メラニン量を用量依存的に減少させ, トルラ酵母抽出物濃度 1 μg GlcCer eq./ml でコントロールよりも有意に減少した ($p < 0.05$, 図 3.1 A)。GlcCer はチロシナーゼ活性を阻害することによってメラニン生成を減少させることが報告されている [13] ため, トルラ酵母抽出物のチロシナーゼ活性を測定した。トルラ酵母抽出物濃度 5 μg GlcCer eq./ml 以上では, B16 マウスメラノーマ細胞において用量依存的にチロシナーゼ活性を有意に阻害した ($p < 0.05$, 図 3.1 B)。

次に, トルラ酵母, コメ, トウモロコシ抽出物 (5 μg GlcCer eq./ml) におけるメラニン生成に対する作用の比較検討を行った。メラニン生成率は, トルラ酵母 37.1, コメ 63.9, トウモロコシ 49.9% of control であり, 全ての抽出物で, コントロールよりも有意に減少した (すべて $p < 0.01$)。中でも, トルラ酵母抽出物がメラニン量を最も減少させた (図 3.1 C)。チロシナーゼ活性率についても, トルラ酵母 77.7, コメ 61.9, トウモロコシ 67.3% of control で全ての抽出物で有意に阻害された (すべて $p < 0.01$)。しかしながら, 食品抽出物間に有意差はなかった (図 3.1 D)。トルラ酵母およびトウモロコシ抽出物のチロシナーゼ活性阻害に対するメラニン生成抑制の比 (メラニン生成抑制率/チロシナーゼ活性阻害率) は, それぞれ 2.52, 1.47 であり, ポジティブコントロールの 0.83 より高かった。しかしながら, コメ抽

出物のチロシナーゼ活性阻害に対するメラニン生成抑制の比は 0.95 であり、ポジティブコントロールと同程度であった (図 3.3 A)。

3.3.2 トルラ酵母 GlcCer および植物, 菌類 GlcCer のメラニン生成およびチロシナーゼ活性の比較

トルラ酵母, キノコ, コメ, コムギ, トウモロコシ GlcCer のメラニン生成に対する作用を比較するため, メラニン量およびチロシナーゼ活性を測定した。キノコ, コムギ GlcCer はメラニン生成を抑制しなかったが, トルラ酵母, コメ, トウモロコシ GlcCer はそれぞれ 82.8, 70.2, 67.1% of control と有意に抑制した (それぞれ $p=0.01$, $p<0.01$, $p<0.01$, 図 3.2 A)。トウモロコシ, トルラ酵母 GlcCer はチロシナーゼ活性をそれぞれ 81.0, 65.6% of control と有意に阻害した (それぞれ $p=0.01$, $p=0.02$, 図 2.2 B)。

トルラ酵母, トウモロコシ GlcCer のチロシナーゼ活性阻害に対するメラニン生成抑制の比はそれぞれ 0.9, 1.0 であり, ポジティブコントロールの 0.8 とほぼ同じであったが, コメ GlcCer は 2.6 と高値であった (図 3.3 B)。

3.3.3 GlcCer を除いたトルラ酵母抽出物 (GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物) のメラニン生成の作用機序

トルラ酵母抽出物はトルラ酵母 GlcCer よりも強いメラニン生成抑制作用を示した (図 3.1 C, 3.2 A) ため, GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物がメラニン生成に抑制効果があるかを検討した。

GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物は, メラニン量を用量依存的に有意に減少させた ($p<0.05$, 図 3.4 A)。GlcCer 含有トルラ酵母抽出物のチロシナーゼ阻害作用は GlcCer 含有量に依存したため (図 3.3 B), GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物のメラニン生成抑制作用は, 他の作用機序であると考えられる。そこで, まず GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物のフェオメラニン生成抑制作用を評価した。メラニン量は, 細胞を NEM で処理することによって増加した。し

かしながら、GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物と NEM で細胞を培養した際のメラニン生成率は 24.9% of control であり、GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物のみの場合の 26.1% of control とほぼ同等であった (図 3.4B)。次に、GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物が、メラニン生成経路酵素の 1 つである TRP1 のタンパク質発現を抑制するかを調べた[1]。GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物は、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で TRP1 タンパク質の発現を用量依存的に有意に抑制した ($p < 0.05$, 図 3.4C)。

3.4 考察

本研究で、トルラ酵母および植物抽出物はメラニン生成を有意に抑制し、トルラ酵母抽出物はコメやトウモロコシ抽出物より強い抑制作用を示した。対照的に、トルラ酵母 GlcCer は、コメ、トウモロコシ GlcCer よりもメラニン生成抑制作用が弱かった。これらのことから、チロシナーゼ活性阻害作用は、抽出物や GlcCer の原料によって異なることが明らかとなった。トルラ酵母抽出物とトルラ酵母 GlcCer の GlcCer 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ における、チロシナーゼ活性率はそれぞれ約 78.7, 81.0%であった。本研究では、トルラ酵母 GlcCer のチロシナーゼ以外の酵素の活性等は測定していないが、GlcCer のメラニン生成抑制作用はチロシナーゼ阻害によるものと報告されていることや[13]、本件研究においてもトルラ酵母抽出物とトルラ酵母 GlcCer のチロシナーゼ活性阻害率が同程度であったことから、トルラ酵母抽出物中のチロシナーゼ活性阻害物質は、トルラ酵母 GlcCer の作用であると推察した。

一方、トルラ酵母抽出物は GlcCer 以外にもメラニン生成を抑制する成分を有することやその成分はチロシナーゼ活性阻害以外のメカニズムを介することが示唆された。そこで GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物を作成し、検討したところ、GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物は、メラニン生成を用量依存的に有意に抑制した (図 3.4A)。メラニン生成抑制のメカニズムの検討では、GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物はメラニン生成における TRP1 タンパク質発現を抑制した (図 3.4C)。TRP1 は、チロシナーゼのユーメラニン生成の下流における

メラニン生成経路に関与するメラニン合成酵素である[1,20]。これらの結果より、トルラ酵母抽出物はチロシナーゼ活性阻害作用を有するトルラ酵母 GlcCer と TRP1 タンパク質発現を抑制する未知の成分の相加効果よりトルラ酵母 GlcCer よりも強いメラニン生成抑制作用を示すことが明らかとなった。

先行研究では、GlcCer を産生する酵母の一種である *Saccharomyces kluyveri* 由来の GlcCer やセラミドがチロシナーゼ阻害を通してメラニン生成を抑制することを報告している[3, 12, 13, 21]。本研究の結果では、トルラ酵母、トウモロコシ GlcCer はメラニン生成抑制率/チロシナーゼ活性阻害率の比がポジティブコントロールとほぼ一致した(図 3.3B)。一方、キノコ、コムギ GlcCer はメラニン生成抑制効果を認めなかった。

原料による生理活性の違いは、各化合物中のスフィンゴイド骨格、および/または脂肪酸などの構造上の違いに起因していると考えられる[14, 15, 22]。さらに、二重結合の数やスフィンゴイド塩基のメチル化の程度が生理活性に寄与することが知られている[23, 24]。

本研究の限界として、GlcCer 以外のメラニン生成抑制作用を有するトルラ酵母抽出物中の成分を特定していないことが挙げられる。トルラ酵母抽出物中の未知の成分は、メラニン生成抑制作用を有することが報告されているスフィンゴシン-1-リン酸などのセラミド代謝物であることが考えられる[25]。また、ヒトとマウスの間には TRP1 活性化のメカニズムが異なることが報告されている[26]。ヒトにおいてもトルラ酵母 GlcCer のメラニン生成への作用を検討する必要があるが、ヒト試験でも褐色斑点を抑制する傾向が見られたことから一定の効果は見られると考える。

3.5 結論

トルラ酵母抽出物はメラニン生成に対して抑制効果を有し、評価した抽出物の中で最も強い効果を示した。トルラ酵母抽出物は、チロシナーゼ依存性および非依存性経路を介してメラニン生成を抑制した。また、本研究で成分は特定できていないが、GlcCer 以外の抽出物

中の成分もメラニン生成抑制に関与していることが示された。本研究の結果は、トルラ酵母抽出物中の複数の成分により、メラニン生成を強く抑制する可能性が示唆された。

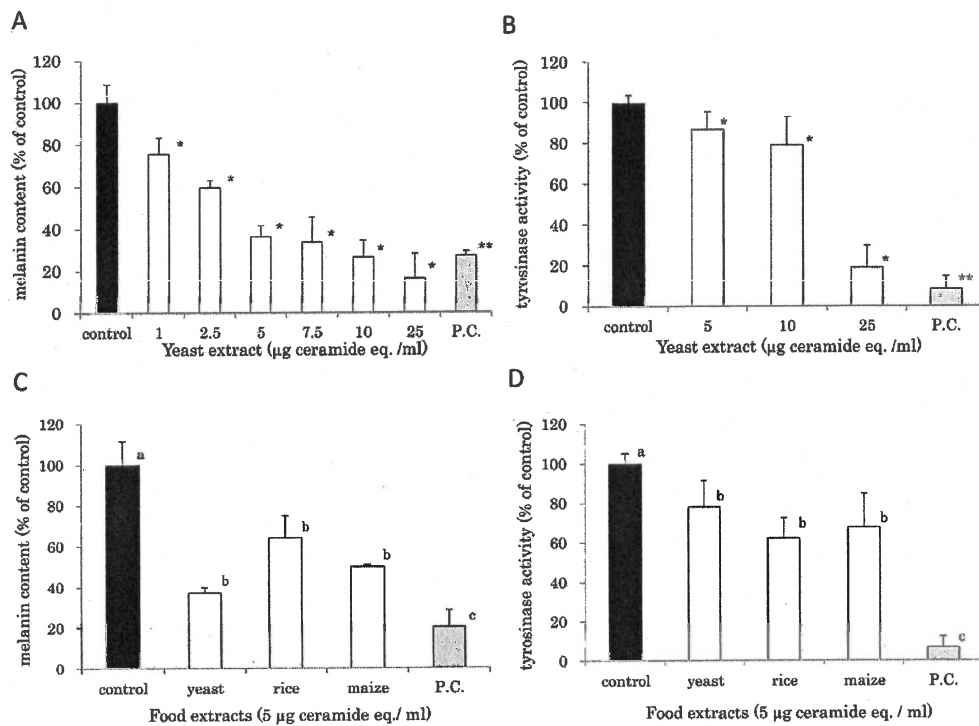


図 3.1 トルラ酵母および植物抽出物のメラニン生成率およびチロシナーゼ活性率

A) トルラ酵母抽出物のメラニン生成率, B) トルラ酵母抽出物のチロシナーゼ活性率, C) 植物抽出物のメラニン生成率, D) 植物抽出物のチロシナーゼ活性率

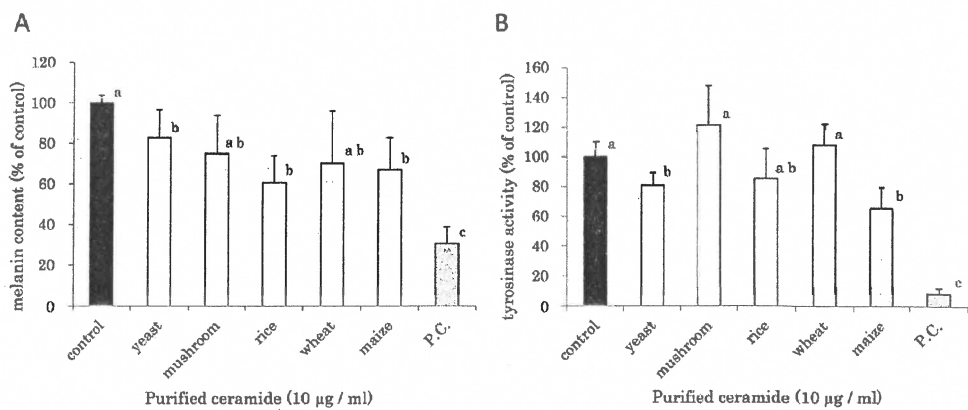


図 3.2 トルラ酵母および植物 GlcCer のメラニン生成率およびチロシナーゼ活性率

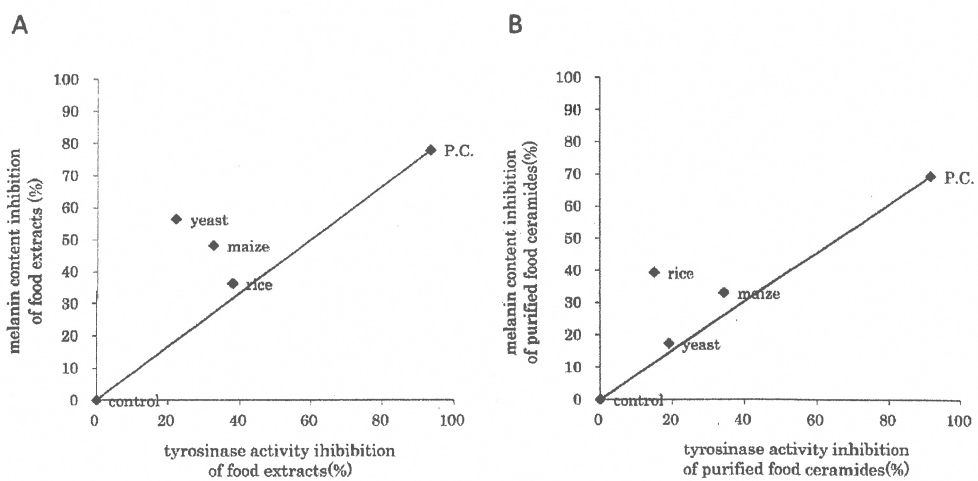


図 3.3 抽出物および GlcCer のメラニン生成抑制率とチロシナーゼ活性阻害率の相関図

A) 抽出物, B) GlcCer

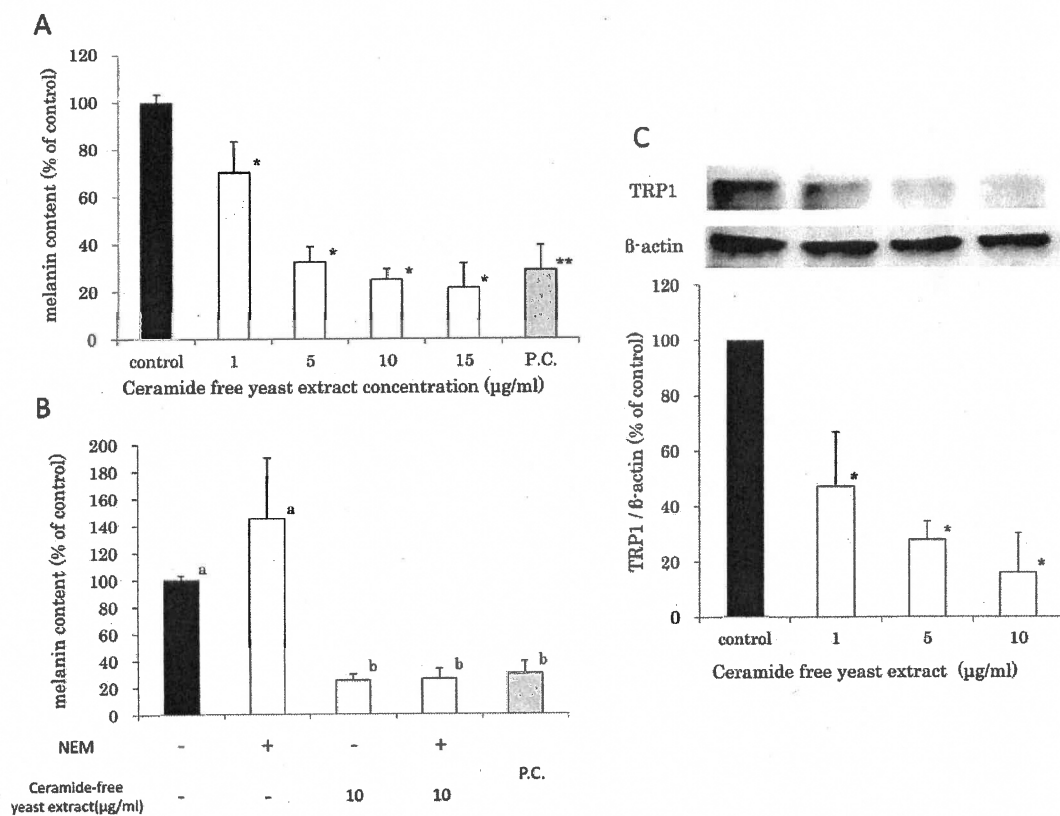


図 3.4 GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物のメラニン生成抑制作用

A) メラニン生成抑制作用, B) NEM 添加によるメラニン生成抑制作用, C) TRP1 タンパク発現

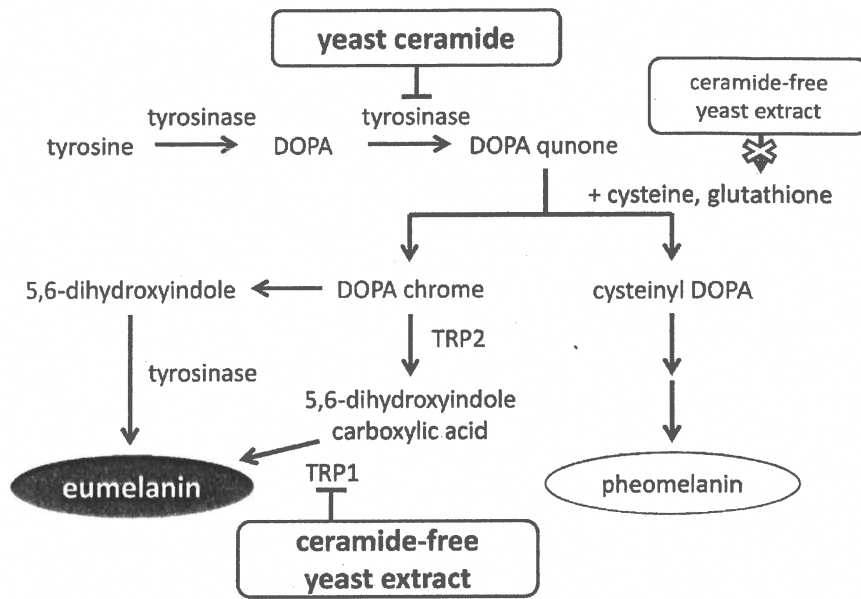


図 3.5 トルラ酵母抽出物のメラニン生成抑制作用のメカニズム

参考文献

1. Del Marmol V, Beermann F: **Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation.** *FEBS letters* 1996, **381**:165-168.
2. Le Pape E, Wakamatsu K, Ito S, Wolber R, Hearing VJ: **Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor.** *Pigment cell & melanoma research* 2008, **21**:477-486.
3. Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, Hearing VJ: **Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase.** *Journal of Investigative Dermatology* 2007, **127**:751-761.
4. Brenner M, Hearing VJ: **The protective role of melanin against UV damage in human skin.** *Photochemistry and photobiology* 2008, **84**:539-549.
5. Yoshiki R, Nakamura M, Tokura Y: **[The biological role of UVB-induced cutaneous immunosuppression].** *J uoeh* 2012, **34**:77-83.
6. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ: **Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light.** *N Engl J Med* 1997, **337**:1419-1428.
7. Gilchrest BA, Yaar M: **Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level.** *Br J Dermatol* 1992, **127 Suppl 41**:25-30.
8. Kim YJ, Uyama H: **Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future.** *Cellular and molecular life sciences CMLS* 2005, **62**:1707-1723.
9. Choi HR, Kang YA, Lee HS, Park KC: **Disulfanyl peptide decreases melanin synthesis via receptor - mediated ERK activation and the subsequent downregulation of MITF and tyrosinase.** *International journal of cosmetic science* 2016, **38**:279-285.
10. Smit N, Vicanova J, Pavel S: **The hunt for natural skin whitening agents.** *International*

- journal of molecular sciences* 2009, **10**:5326-5349.
11. Jeong HS, Choi HR, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, Park KC, Kim DS: **Ceramide PC102 inhibits melanin synthesis via proteasomal degradation of microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase.** *Molecular and cellular biochemistry* 2013, **375**:81-87.
 12. Kim DS, Kim SY, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Park KC: **Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes.** *Cellular signalling* 2002, **14**:779-785.
 13. Kinoshita M, Hori N, Aida K, Sugawara T, Ohnishi M: **Prevention of melanin formation by yeast cerebroside in B16 mouse melanoma cells.** *Journal of oleo science* 2007, **56**:645-648.
 14. 長良サイエンス株式会社: セラミド・リン脂質等関連試薬価格表
http://www.nsgifu.jp/products/pdf/NGR_ceramides.pdf (2017年1月11日)
 15. Mor V, Farnoud AM, Singh A, Rella A, Tanno H, Ishii K, Kawakami K, Sato T, Del Poeta M: **Glucosylceramide administration as a vaccination strategy in mouse models of cryptococcosis.** *PloS one* 2016, **11**:e0153853.
 16. Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y, Fukuda M: **Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis--biochemical study using cultured B16 melanoma cells.** *Nihon Hifuka Gakkai zasshi The Japanese journal of dermatology* 1991, **101**:609-613.
 17. Usuki A, Ohashi A, Sato H, Ochiai Y, Ichihashi M, Funasaka Y: **The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells.** *Experimental dermatology* 2003, **12**:43-50.
 18. Yap W, Zaiden N, Xu C, Chen A, Ong S, Teo V, Yap Y: **Gamma - and delta - tocotrienols inhibit skin melanin synthesis by suppressing constitutive and UV - induced tyrosinase activation.** *Pigment cell & melanoma research* 2010, **23**:688-692.
 19. Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M: **Inhibitory effect of cysteine and glutathione on**

- phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Food Chemistry* 2006, **98**:158-163.
20. Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez - Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García - Borrón J, Hearing V: **Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis.** *The EMBO journal* 1994, **13**:5818-5825.
 21. Saito K, Takakuwa N, Ohnishi M, Oda Y: **Presence of glucosylceramide in yeast and its relation to alkali tolerance of yeast.** *Applied microbiology and biotechnology* 2006, **71**:515-521.
 22. Sugawara T, Aida K, Duan J, Hirata T: **Analysis of glucosylceramides from various sources by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry.** *Journal of oleo science* 2010, **59**:387-394.
 23. Aida K, Kinoshita M, Sugawara T, Ono J, Miyazawa T, Ohnishi M: **Apoptosis inducement by plant and fungus sphingoid bases in human colon cancer cells.** *Journal of Oleo Science* 2004, **53**:503-510.
 24. Sugawara T, Kinoshita M, Ohnishi M, Nagata J, Saito M: **Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells.** *The Journal of nutrition* 2003, **133**:2777-2782.
 25. Kim DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC: **Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation.** *Journal of cell science* 2003, **116**:1699-1706.
 26. Boissy RE, Sakai C, Zhao H, Kobayashi T, Hearing VJ: **Human tyrosinase related protein - 1 (TRP - 1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP - 1.** *Experimental dermatology* 1998, **7**:198-204.

第4章

ヒト線維芽細胞におけるトルラ酵母抽出物の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響

4.1 緒言

皮膚は表皮, 真皮, 皮下組織の3層から構成されている。表皮は保湿やバリア機能を有しており, 真皮は弾力性の維持に関与している[1]。皮膚の弾力性は, 線維芽細胞とコラーゲン線維の3次元ネットワーク構造によってもたらされるものである[2]。真皮の総コラーゲンの約80%がI型コラーゲンである[3]。加齢および光老化した皮膚において, 弾力性の低下は, 線維芽細胞とプロコラーゲン産生の減少とコラーゲナーゼの増加によって引き起こされる[4]。弾力性の低下によるこれらの作用により, 皮膚のたるみやシワが生じる。

GlcCerの表皮における保湿効果やバリア機能については既に報告されているが[5-9], 真皮における弾力性効果についての報告は少ない。Horiらは, ビート由来GlcCerによりエラスチンの増加による真皮弾力性への効果を報告している[10]。また, 菊池らは, コンニャクGlcCerではなく構成物であるスフィンゴイド骨格によるコラーゲン産生促進作用を報告している[11, 12]。しかしながら, GlcCerが直接, 線維芽細胞の増殖およびコラーゲン産生を促進したという報告はない。

トルラ酵母GlcCerは植物GlcCerと異なった構造をしているため[13], 生理作用も異なる可能性がある[14]。そこで本研究では, 我々は細胞実験によるトルラ酵母抽出物とトルラ酵母GlcCerの真皮弾力性への影響を評価した。

4.2 方法

4.2.1 試薬

トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母GlcCerは興人ライフサイエンス株式会社(Tokyo,

Japan) より提供を受けた。Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) と牛胎仔血清 (fetal bovine serum (FBS)) はそれぞれ Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA) と JR Scientific (Woodland, CA, USA) から購入した。トリプシン, 塩酸, 酢酸, シリウスレッド は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。エタノール, 1 M 水酸化ナトリウム 水溶液, ウシ皮由来ネイティブコラーゲン (I型コラーゲン) は, Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), 純正化学株式会社 (Tokyo, Japan), 株式会社高研 (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。Cell Counting Kit-8 (CCK-8), ヒトコラーゲン タイプ I ELISA kit は, 株式会社同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan), 株式会社エーセル (Kanagawa, Japan) よりそれぞれ購入した。

4.2.2 細胞培養

真皮線維芽細胞 (Normal, Human), 正常ヒト皮膚線維芽細胞 (成人) (Human Dermal Fibroblast adult, HDFa) はそれぞれ ATCC (Rockville, MD, USA), Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA) から購入した。真皮線維芽細胞はトルラ酵母抽出物の評価に, HDFa はトルラ酵母 GlcCer の評価にそれぞれ使用した。

これらの細胞を 1%FBS-DMEM 培地で 37°C, 二酸化炭素濃度 5%条件下で培養した。本研究では, 継代数が 6 以下の細胞を使用した。細胞増殖およびコラーゲン産生の測定実験では, 細胞は 3 日間 (72 時間), 最終濃度 0.5–25 µg GlcCer eq./ml のトルラ酵母抽出物もしくはトルラ酵母 GlcCer を含む 1%FBS-DMEM 培地で培養した。

4.2.3 細胞増殖 (MTT アッセイ)

トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母 GlcCer の真皮線維芽細胞の細胞増殖への影響について, CCK-8 を用い, 製造元プロトコールに準じて測定した。トルラ酵母抽出物 (0.5–25 µg GlcCer eq./ml) もしくはトルラ酵母 GlcCer (1–25 µg/ml)を含んだ 1%FBS-DMEM 培地で 72 時間培養した細胞の各ウェルに CCK-8 を加え, 37°Cで 1 時間反応させた。その後, 450 nm

の吸光度を測定し、コントロールを 100 とした時のコントロールに対する割合(%)を求め、細胞増殖率とした。

4.2.4 I型コラーゲン産生量測定 (ELISA)

細胞培養培地中の I 型コラーゲン産生量をヒト I 型コラーゲン ELISA キットにて測定した。トルラ酵母抽出物 (0.5–25 µg GlcCer eq./ml) で 72 時間処理した後、培養液を回収して ELISA に使用した。ELISA キットは製造元のプロトコールに準じて使用した。

4.2.5 コラーゲン量測定

細胞培養培地中のコラーゲン量はシリウスレッドを使用した比色法により測定した[15]。トルラ酵母 GlcCer (1–25 µg/ml) で処理した後、培地を回収し、0.1%シリウスレッド 0.5 M 酢酸溶液を加えて混和した。これらの溶液を室温で 30 分間静置した。遠心分離後、上清を取り除き、沈殿物を 10 mM 塩酸で洗浄した。その沈殿物に 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて溶解し、その溶解液を 515 nm の吸光度で測定した。コラーゲン量はコントロールに対する%で表した。

4.2.6 コラーゲンゲル収縮

コラーゲンゲル収縮は西山らの方法を改変して測定した[16, 17]。線維芽細胞含有コラーゲン溶液は、2 ml のコラーゲン溶液 (3 mg/ml), 1 ml の 3×DMEM 培地, 1.67 ml の 10% FBS-DMEM 培地, 0.33 ml の FBS, 1 ml の 10%FBS-DMEM の細胞懸濁液を氷上で混和し、準備した。混和した細胞を含む溶液を 6-well プレートに分注し、37°C で 1 時間保温した。保温後、トルラ酵母抽出物 (2.5–25 µg GlcCer 当量 (eq.) /ml) もしくはトルラ酵母 GlcCer (2.5–25 µg/ml) を添加した 10% FBS-DMEM を培養培地として各ウェルに入れ、ゲルをプレートの周りから外した。培養培地は 2 日毎に新しいものに交換した。ゲルの直径を 7 日間測定した。コラーゲンゲル収縮はコントロールに対する%として示した。

4.2.7 統計解析

統計解析はエクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。データは Kruskal-Wallis 検定の後、用量依存性の検定には Shirley-Williams, 群間比較には Steel-Dwass の多重比較検定により有意差を求めた。結果は平均値±標準偏差 (SD) で示した。すべての結果は $p < 0.05$ を統計学的有意とし, Shirley-Williams の多重比較の有意差は $p < 0.05$ で表記した。

4.3 結果

4.3.1 ヒト真皮線維芽細胞におけるトルラ酵母抽出物の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響

トルラ酵母抽出物は, 抽出物濃度 $10 \mu\text{g GlcCer eq./ml}$ までは用量依存的にヒト真皮線維芽細胞の細胞増殖を促進した (図 4.1 A)。トルラ酵母抽出物濃度 $0.5 \mu\text{g GlcCer eq./ml}$ 以上で, 細胞増殖が見られた ($p < 0.05$, 図 4.1 A)。I型コラーゲン量では, トルラ酵母抽出物濃度 $25 \mu\text{g GlcCer eq./ml}$ でのみ増加した ($p < 0.05$, 図 4.1 B)。また, トルラ酵母抽出物濃度 $5 \mu\text{g GlcCer eq./ml}$ と $7.5 \mu\text{g GlcCer eq./ml}$ では, コラーゲングル収縮が見られた (ともに $p = 0.03$, 図 4.1 C, 図 4.3 A)。 $10 \mu\text{g GlcCer eq./ml}$ 以上の濃度ではコラーゲングルの収縮に有意な差はみられなかった。

4.3.2 ヒト真皮線維芽細胞におけるトルラ酵母 GlcCer の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響

トルラ酵母 GlcCer は, 用量依存的にヒト真皮線維芽細胞の細胞増殖を促進し, GlcCer 濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ 以上で有意な増加を示した ($p < 0.05$, 図 4.2 A)。細胞増殖は GlcCer 濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ でプラトーに達した。また, トルラ酵母 GlcCer はコラーゲン産生も用量依存的に促進し, GlcCer 濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ 以上で有意な増加が見られた ($p < 0.05$, 図 4.2 B)。コラーゲングル収縮

は、トルラ酵母 GlcCer 濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ と 7.5 $\mu\text{g/ml}$ で有意な収縮が見られた(それぞれ $p=0.01$, 0.03, 図 4.2 C, 図 4.3 B)。GlcCer 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上では有意な差はみられなかった。

4.4 考察

トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母 GlcCer は、皮膚線維芽細胞を有意に増殖させ、コラーゲン産生量を有意に増加させ、コラーゲンを有意に収縮させた。本知見は我々の知り得る限り、初めての報告である。

Hori ら[10]は、既にフィブロネクチン合成促進によるヒトセラミドの皮膚弾性への寄与について報告しているが、その報告では線維芽細胞増殖やコラーゲン合成への影響はないとしている。本研究の結果では、線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生は有意に増加し、先行研究の結果とは反するものとなった。本研究で用いたトルラ酵母由来 GlcCer はスフィンゴイド骨格の 9 位にメチル基を有している[18]が、ヒトやコンニャク GlcCer のスフィンゴイド骨格にはメチル基は存在しないことが影響していると考えられる(図 4.4)。加えて、Hori らのヒト GlcCer の報告[10]は I 型コラーゲン量の測定に免疫蛍光染色を使用しており、本研究で用いた ELISA 法とは方法が異なることも影響していると考えられる。

本研究では、トルラ酵母抽出物における皮膚線維芽細胞の賦活作用を有する成分は、トルラ酵母 GlcCer であると考えた。その一方、トルラ酵母抽出物は、GlcCer 量として同じ濃度のトルラ酵母 GlcCer の結果と比べて、細胞増殖とコラーゲン産生に及ぼす影響が弱かった。この結果を説明し得る理由として、トルラ酵母抽出物が、細胞増殖およびコラーゲン産生の作用を阻害する成分、または GlcCer と結合または不活性化する成分を含有することが推察された。

また、真皮中のコラーゲン線維は 80%が I 型で約 10%が III 型コラーゲンである[3, 19]。そのため、本研究では、I 型コラーゲンに着目し、トルラ酵母 GlcCer によって増加することを明らかにした。加齢により I 型と III 型の比率(I/III 比)が減少するという報告があり[20]、

今後、加齢との関連を知るためには III 型コラーゲンにも着目した研究が必要あると考える。

本研究では、コラーゲングル収縮において、GlcCer の用量依存的な作用は見られなかった。先行研究において、ゲル中の線維芽細胞の増殖は細胞とコラーゲン線維の接触する程度や分布によって抑制されること[21]やゲル中のコラーゲン濃度が増加したとき、コラーゲングル収縮が抑制される[22]ことが報告されている。この報告によると、コラーゲン濃度が 1.0 mg/ml 以上で、コラーゲングル収縮が抑制されるとし、コラーゲングル収縮には至適なコラーゲン濃度が存在することを示している。本研究では、GlcCer 濃度 5 μ g/ml と 7.5 μ g/ml がコラーゲングル収縮にとって至適濃度であった。3次元のコラーゲングル培養は2次元の単層培養と比べて、より *in vivo* の状態に近い[23]。ゲル収縮の促進は、コラーゲン線維間のネットワークが強化される状態を観察しており、これは生体で皮膚の弾力性が増すことをモデル化したものである[24]。トルラ酵母抽出物とトルラ酵母 GlcCer の皮膚の弾力性に寄与する可能性が示唆された。

本研究の限界は、コラーゲン以外の細胞外基質成分などの評価を行っていないことである。真皮の弾力性はインテグリンや matrix metalloproteinases, ヒアルロン酸, フィブロネクチンといった他の細胞外基質成分によっても影響を受ける[4,25]。これらの細胞外基質に係わる経路が活性化されている可能性も考えられるため、今後、他の細胞外基質などの評価を行う研究が必要である。

4.5 結論

トルラ酵母抽出物とトルラ酵母 GlcCer は線維芽細胞増殖、コラーゲン産生量増加、コラーゲングル収縮作用を有することが明らかとなった。トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母 GlcCer は共に皮膚弾力性に寄与する可能性が推察された。

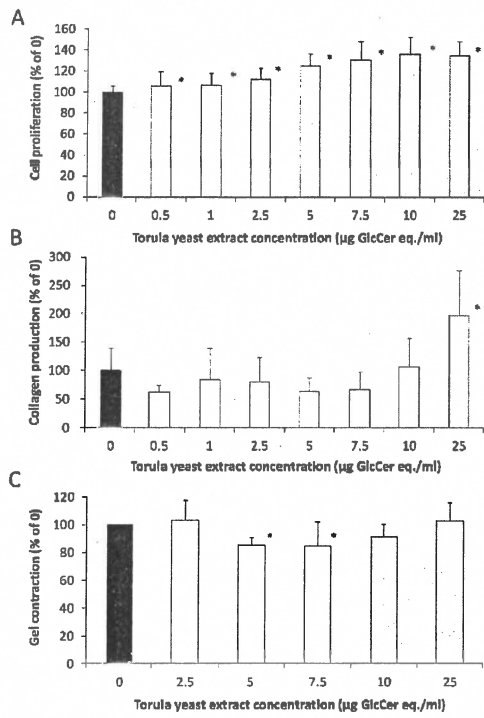


図 4.1 トルラ酵母抽出物の真皮線維芽細胞賦活作用

A)真皮線維芽細胞増殖作用, B)コラーゲン産生作用, C)コラーゲングル収縮作用

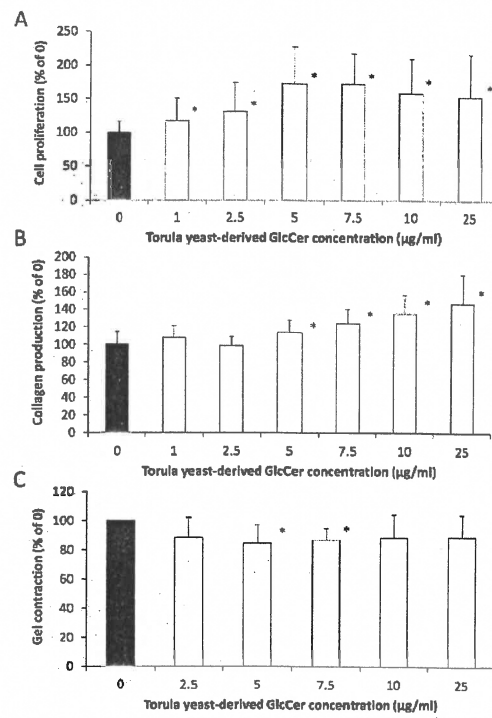


図 4.2 トルラ酵母 GlcCer の真皮線維芽細胞賦活作用

A)真皮線維芽細胞増殖作用, B)コラーゲン産生作用, C)コラーゲングル収縮作用

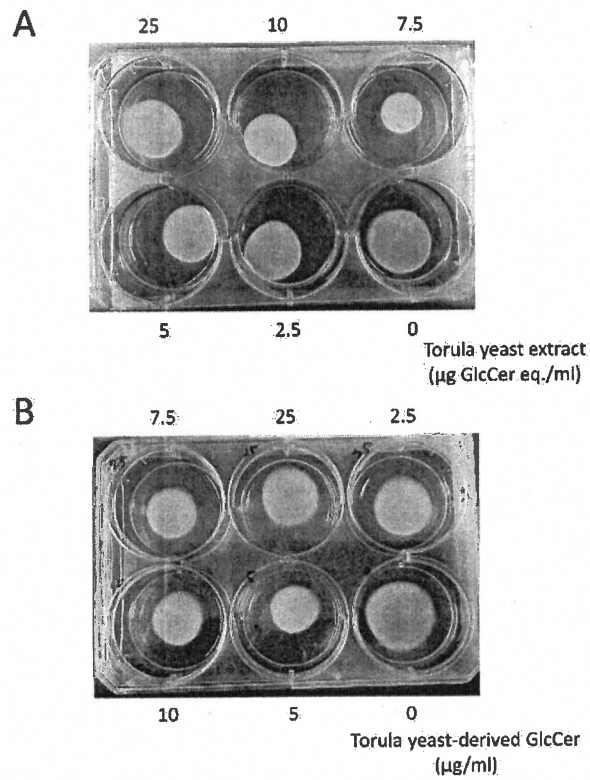
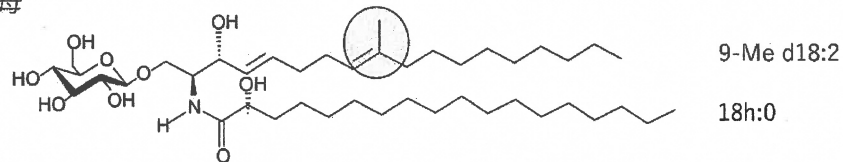


図 4.3 コラーゲンゲル収縮試験

A)トルラ酵母抽出物, B)トルラ酵母 GlcCer

トルラ酵母



ビート

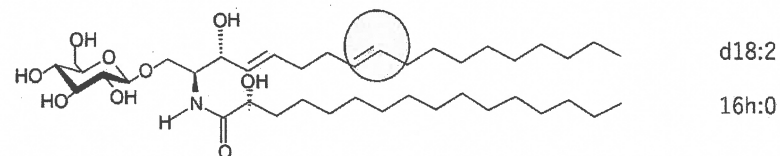


図 4.4 トルラ酵母とビート GlcCer の構造の違い

参考文献

1. Baumann L: **Skin ageing and its treatment.** *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 2007, **211**:241-251.
2. Grinnell F: **Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices.** *Trends in Cell Biology* 2003, **13**:264-269.
3. Utto J, Pulkkinen L, Chu M: **Collagen.** *Dermatology in General Medicine New York, NY: McGraw-Hill* 2003:165-179.
4. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ: **Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications.** *Arch Dermatol* 2008, **144**:666-672.
5. Asai S, Miyachi H: **[Evaluation of skin-moisturizing effects of oral or percutaneous use of plant ceramides].** *Rinsho Byori* 2007, **55**:209-215.
6. Duan J, Sugawara T, Hirose M, Aida K, Sakai S, Fujii A, Hirata T: **Dietary sphingolipids improve skin barrier functions via the upregulation of ceramide synthases in the epidermis.** *Experimental dermatology* 2012, **21**:448-452.
7. Ideta R, Sakuta T, Nakano Y, Uchiyama T: **Orally Administered Glucosylceramide Improves the Skin Barrier Function by Upregulating Genes Associated with the Tight Junction and Cornified Envelope Formation.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2012, **76**:2012E2013-2012E2013.
8. Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y: **Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function.** *Biochimie* 2009, **91**:784-790.
9. Uchiyama T, Nakano Y, Ueda O, Mori H, Nakashima M, Noda A, Ishizaki C, Mizoguchi M: **Oral intake of glucosylceramide improves relatively higher level of transepidermal water loss in mice and healthy human subjects.** *Journal of Health Science* 2008, **54**:559-566.
10. Hori M, Kishimoto S, Tezuka Y, Nishigori H, Nomoto K, Hamada U, Yonei Y: **Double-**

- blind study on effects of glucosyl ceramide in beet extract on skin elasticity and fibronectin production in human dermal fibroblasts. *Anti-Aging Medicine* 2010, 7:129-142.
11. 菊池可菜子, 松村賢次, 向井克之: こんにゃくスフィンゴイドによるコラーゲン産生促進. *フレグランスジャーナル* 2009, 37:68-71.
 12. 菊池可菜子, 松村賢次, 向井克之: BIO R&D こんにゃくセラミドによるコラーゲン産生促進作用について. *バイオインダストリー* 2010, 27:47-52.
 13. Sperling P, Heinz E: **Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2003, 1632:1-15.
 14. Kinoshita M, Hori N, Aida K, Sugawara T, Ohnishi M: **Prevention of melanin formation by yeast cerebroside in B16 mouse melanoma cells.** *Journal of oleo science* 2007, 56:645-648.
 15. Marotta M, Martino G: **Sensitive spectrophotometric method for the quantitative estimation of collagen.** *Anal Biochem* 1985, 150:86-90.
 16. Nishiyama T, Horii I, Nakayama Y, Ozawa T, Hayashi T: **A distinct characteristic of the quiescent state of human dermal fibroblasts in contracted collagen gel as revealed by no response to epidermal growth factor alone, but a positive growth response to a combination of the growth factor and saikosaponin b1.** *Matrix* 1990, 10:412-419.
 17. Nishiyama T, Akutsu N, Horii I, Nakayama Y, Ozawa T, Hayashi T: **Response to growth factors of human dermal fibroblasts in a quiescent state owing to cell-matrix contact inhibition.** *Matrix* 1991, 11:71-75.
 18. Mor V, Farnoud AM, Singh A, Rella A, Tanno H, Ishii K, Kawakami K, Sato T, Del Poeta M: **Glucosylceramide administration as a vaccination strategy in mouse models of cryptococcosis.** *PloS one* 2016, 11:e0153853.
 19. Epstein EHJ, H Munderloh N: *Human skin collagen. Presence of type I and type III at all*

*levels of the dermis.*1978.

20. Cheng W, Yan-hua R, Fang-gang N, Guo-an Z: **The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury.** *African Journal of Biotechnology* 2011, **10**:2524-2529.
21. Nishiyama T, Tsunenaga M, Nakayama Y, Adachi E, Hayashi T: **Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix.** *Matrix* 1989, **9**:193-199.
22. Nishiyama T, Tominaga N, Nakajima K, Hayashi T: **Quantitative evaluation of the factors affecting the process of fibroblast-mediated collagen gel contraction by separating the process into three phases.** *Coll Relat Res* 1988, **8**:259-273.
23. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z: **Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture.** *Physiology (Bethesda)* 2017, **32**:266-277.
24. 幸野健, 谷井司, 古川雅祥, 北島淳一, 中川浩一, 水野信之, 谷口彰治, 石井正光, 濱田稔夫: **ヒト線維芽細胞によるコラーゲン・ゲル収縮現象と加齢の関連性.** *皮膚* 1990, **32**:190-195.
25. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ: **Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound.** *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016, **5**:119-136.

第5章

総括

本研究は、GlcCer含有トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母由来GlcCerの皮膚における機能性について検討した。

第1章では、論文の序論として、本研究で着目したトルラ酵母やGlcCerについて、皮膚細胞における有効性やその応用について言及し、本研究の目的を述べた。用いたトルラ酵母は、①トルラ酵母の既存製品の製造過程から出るトルラ酵母残渣（産業廃棄物）からの抽出方法の確立によって低コストでの供給が可能である、②連続発酵による品質変動の少ない原料の安定供給ができる、③GlcCer含有量が0.15%と比較的多い、④食経験から安全性も確保されていることが利点である[1-4]。GlcCerはセラミドにグルコースが結合した物質であり、セラミドと同様に皮膚の保湿等の研究報告があり[5-7]、その原料として、コメやコンニャク、コムギ等が利用されているが、GlcCer含有量が、トルラ酵母残渣と比べて10分の1程度と少ない[1, 8]。また、GlcCerの構造はそれぞれの原料で側鎖や不飽和度が異なり、それによって生理活性に差があるとの報告もある[9]。そこで本研究では、安全で安価に入手でき、既存製品の製造過程により得られる産業廃棄物であるトルラ酵母残渣より抽出されるGlcCer含有トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母由来GlcCerの有用性について述べた。

第2章のトルラ酵母GlcCerの経口摂取がヒトの皮膚に与える影響に関する研究では、健康成人男女に4週間にわたり1.8mgのトルラ酵母GlcCerを毎日摂取させ、試験期間前後の皮膚状態を客観的、主観的に評価した。客観的評価では、皮膚のバリア機能や保湿を示すTEWL、メラニン生成を示す褐色斑点の抑制が認められ、主観的評価では、肌荒れの改善が見られた。また、客観的評価のシワについても悪化を抑制する傾向があり、トルラ酵母GlcCerのヒトにおける有用性が示唆された。トルラ酵母GlcCerの経口摂取による皮膚状態改善作用を有する結果が得られた。機能性表示食品は、臨床研究（ヒト試験）または研究レビューによる関与成分等の機能性の科学的根拠を示す必要がある[10]。また、コメGlcCerが

特定保健用食品の関与成分として認められていることから[11], 本研究のヒト試験の結果は, 今後のトルラ酵母 GlcCer の機能性食品等への応用に貢献すると考える。

第 3 章のメラニン生成抑制作用に関する研究では, トルラ酵母または植物の抽出物および GlcCer のメラニン生成とチロシナーゼ活性に対する作用が, 原料によって異なることが明らかとなった。抽出物間比較ではメラニン生成はトルラ酵母が最も抑制し, チロシナーゼ活性はコメが最も阻害した。原料の違いによる GlcCer の比較では, メラニン生成はコメが最も抑制し, チロシナーゼ活性はトウモロコシが最も阻害した。原料によって生理活性が異なる先行研究[9]を支持する結果となった。先行研究では, 真菌 (酵母), 植物 (トウモロコシ), 動物 (ウシ) の GlcCer での比較を行っていたが[9], 本研究では安全性の面から動物性のものを除外した上で, トルラ酵母, キノコ, コメ, コムギ, トウモロコシとより多くの種類の原料で比較を行い, 生理活性の違いを明らかにした。

トルラ酵母の抽出物および GlcCer は, チロシナーゼ活性は同程度であるにも関わらず, メラニン生成抑制効果が抽出物でより高く, 抽出物と GlcCer の結果に乖離が生じた。そこでトルラ酵母抽出物から GlcCer を除いた試料である GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物で評価すると, GlcCer より強い作用を有することが明らかとなった。GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物のメラニン生成抑制の機序を明らかにするため, フェオメラニン生成遮断実験を行ったが, GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物のメラニン生成抑制には影響しなかった。一方, GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物は, メラニン生成の下流酵素である TRP1 のタンパク質発現量を抑制した。この機能性成分は, 本研究では明らかにすることが出来なかったが, トルラ酵母 GlcCer は脂肪酸などの夾雑物が少ないという特徴があり[1, 12], GlcCer と共に抽出されることから, 性質が GlcCer に類似している物質である可能性が高い。また, GlcCer 非含有トルラ酵母抽出物を GlcCer の分析と同じ条件で LC/MS で分析した結果, 分子量 300-500 の物質が 4 種類測定された。特定した分子量から, メラニン生成抑制が報告されているスフィンゴシン-1-リン酸[13] などのセラミド代謝物であることが推察された。

GlcCer のメラニン生成に関する研究は, 我々の知る限りでは細胞実験による評価の報告

しかない[9]。GlcCer 含有抽出物としてパイナップル抽出物の報告があり、ヒト試験を行っているが、この報告ではメラニン生成抑制の有効成分として GlcCer 以外の成分を挙げている[14]。本研究では、ヒト試験でトルラ酵母 GlcCer 摂取が褐色斑点の項目を改善させた。細胞実験では、トルラ酵母 GlcCer がチロシナーゼ活性を阻害することでメラニン生成を抑制することを明らかにした。

第 4 章の真皮線維芽細胞における皮膚弾力性への作用に関する研究では、トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母由来 GlcCer で線維芽細胞増殖、コラーゲン産生の促進作用がみられた。先行研究では、ビート GlcCer は線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生へ影響を及ぼさないと報告されている[15]。コンニャク GlcCer でも、GlcCer ではなく、構成成分のスフィンゴイド骨格が線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生を促進すると報告されている[16, 17]。GlcCer 間の構造の違いが生理活性に影響を及ぼしたと考える。また、より生体条件に近い線維芽細胞含有 3 次元コラーゲンゲルの培養では、有意なゲルの収縮がみられたが、GlcCer には至適濃度があり、それはトルラ酵母抽出物とトルラ酵母 GlcCer で一致した。そのことから、トルラ酵母抽出物中のゲル収縮における有効成分は GlcCer であることが示唆された。我々の知る限りでは、GlcCer の線維芽細胞の増殖およびコラーゲン産生の促進作用に関する報告はない。本研究が初めての報告である。

生体でのシワの形成は真皮中の線維芽細胞やコラーゲンおよび角質層のセラミドの減少により生じることが知られている。本研究では、ヒト試験においてプラセボ群で見られたシワに関する項目の評価における悪化をトルラ酵母 GlcCer 投与群は抑制する知見を得たが、明確な差が出なかった。このことは、マウスなどの動物実験においては、シワの評価をする際にヘアレスマウスに紫外線照射をして光老化を促すモデルを用いるが[18]、ヒト試験では光老化を短期間に促すことはできないため、有意な差が出なかったと考えられる。

細胞実験では、トルラ酵母 GlcCer が線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生の促進およびコラーゲンゲルの収縮促進作用も見られたことから、一部にはこれらの作用がヒト試験でのシワ悪化を抑制する可能性も示唆される。しかしながら、*in vitro* 試験とヒト試験における

投与量(添加量)が大幅に乖離していることより,真のキープレーヤーが何かは不明である。生体での GlcCer の代謝回転などが有効性を発揮しているかもしれないが,さらなる検討が必要である。先行研究ではトウモロコシ GlcCer の摂取がマウスの表皮セラミド合成を促進したという報告もあり[19], 合成経路やその代謝回転などの検討が必要であろう。

本研究では,細胞実験において GlcCer 単体ではなく GlcCer 含有トルラ酵母抽出物の評価も行った。第3章のメラニン生成では,トルラ酵母抽出物とトルラ酵母 GlcCer はチロシナーゼ活性阻害は同程度であったが,メラニン生成抑制に差が生じた。トルラ酵母抽出物により強い阻害が見られ,トルラ酵母抽出物中に GlcCer 以外のメラニン生成抑制成分が含まれていることが明らかとなった。一方,第4章の線維芽細胞の増殖,コラーゲン産生およびコラーゲングル収縮では,トルラ酵母抽出物はトルラ酵母 GlcCer と含有 GlcCer 濃度が同じ量で同様の作用を示した。これより, GlcCer 成分を含むトルラ酵母抽出物はメラニン生成抑制とコラーゲン産生およびコラーゲングル収縮作用に有効であることが判明したことから,産業廃棄物からの抽出物が新規の機能性素材としての産業的応用が期待できるのではないかと考える(図5)。

以上の結果から,本論文はトルラ酵母 GlcCer の保湿,メラニン生成,皮膚の弾力性につながる機能性食品への応用の可能性を見出した。

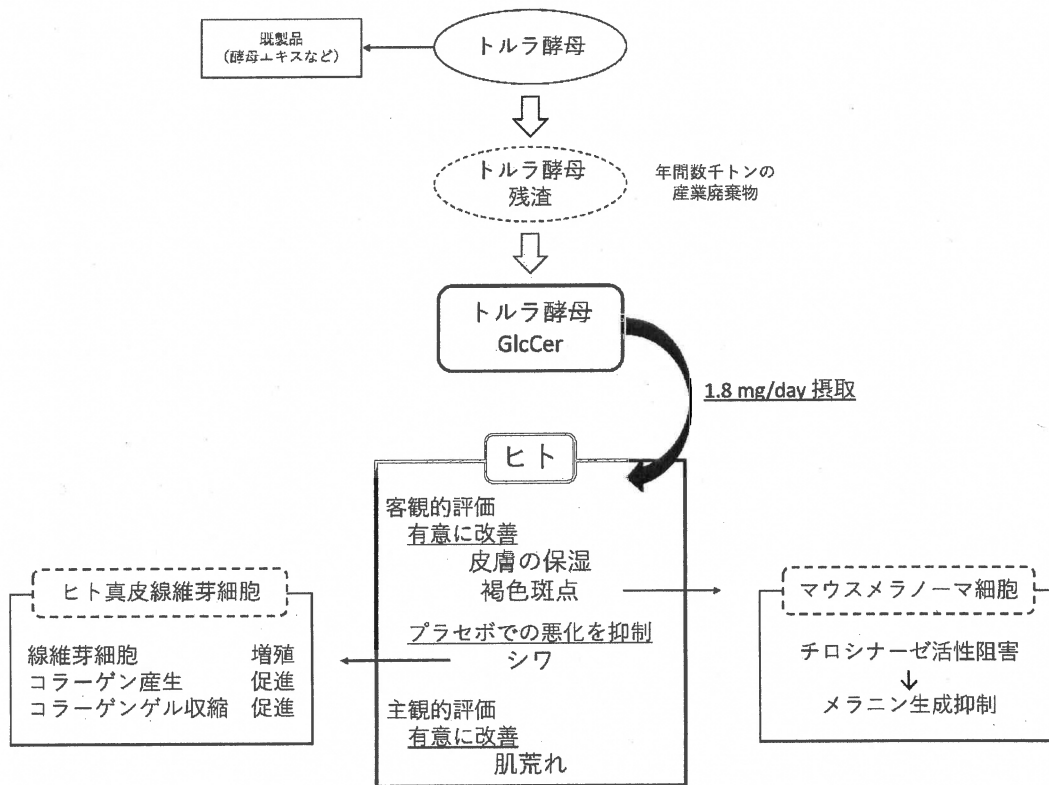


図5 本論文のまとめ

参考文献

1. Sato T, Nakagawa T, Kaji N: **Method for utilizing extraction residue of yeast extract.** United States Patent US 2014/0228305 A1. Inventors: KOHJIN Life Sciences Co., Ltd.; 2014.
2. Weatherholtz W, Holsing G: **Acceptance of torula yeast for use as a food supplement.** *Ecology of Food and Nutrition* 1976, 5:153-159.
3. Food and Drug Administration Office of Federal Register (US): **Part 172 Food additives permitted for direct addition to food for human consumption, 172.896 Dried yeasts.** *The Code of Federal Regulations of the United States of America.* U.S. Government Printing Office; 2012, 121.
4. Institute of Medicine and Codex Committee on Food Chemicals: **Monograph, Yeast, Dried.** *Food Chemicals Codex V.* Washington DC: National Academy Press; 2003, 508.
5. 平河聡: **米胚芽エキス配合粉末顆粒の摂取による全身の皮膚バリア機能に対する改善効果.** *薬理と治療* 2013, 41:1051-1059.
6. Uchiyama T, Nakano Y, Ueda O, Mori H, Nakashima M, Noda A, Ishizaki C, Mizoguchi M: **Oral intake of glucosylceramide improves relatively higher level of transepidermal water loss in mice and healthy human subjects.** *Journal of Health Science* 2008, 54:559-566.
7. Asai S, Miyachi H: **[Evaluation of skin-moisturizing effects of oral or percutaneous use of plant ceramides].** *Rinsho Byori* 2007, 55:209-215.
8. Sugawara T, Miyazawa T: **Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection.** *Lipids* 1999, 34:1231.
9. Kinoshita M, Hori N, Aida K, Sugawara T, Ohnishi M: **Prevention of melanin formation**

- by yeast cerebroside in B16 mouse melanoma cells. *Journal of oleo science* 2007, 56:645-648.
10. 消費者庁: 食品関連事業者の方へ 「機能性表示食品」制度がはじまります!
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/about_foods_with_function_claims/pdf/150810_2.pdf (2019年6月24日)
 11. 消費者庁: 特定保健用食品許可(承認)一覧
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/health_promotion/#m02
(2019年6月24日)
 12. 梶直人, 佐藤寿哉, 中川智寛: 素材レポート トルラ酵母由来グルコシルセラミドの美容素材としての可能性. *食品と開発* 2014, 49:52-54.
 13. Kim DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC: Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *Journal of cell science* 2003, 116:1699-1706.
 14. 鳥家 圭悟, 川嶋 善仁, 大戸 信明, 野嶋 潤, 池岡 佐和子, 田邊 瑞穂, 木曾 昭典: グルコシルセラミド含有パイナップル果実エキスの美容効果. *日本化粧品技術者会誌* 2017, 50:306-313.
 15. Hori M, Kishimoto S, Tezuka Y, Nishigori H, Nomoto K, Hamada U, Yonei Y: Double-blind study on effects of glucosyl ceramide in beet extract on skin elasticity and fibronectin production in human dermal fibroblasts. *Anti-Aging Medicine* 2010, 7:129-142.
 16. 菊池可菜子, 松村賢次, 向井克之: こんにゃくスフィンゴイドによるコラーゲン産生促進. *フレグランスジャーナル* 2009, 37:68-71.
 17. 菊池可菜子, 松村賢次, 向井克之: BIO R&D こんにゃくセラミドによるコラーゲン産生促進作用について. *バイオインダストリー* 2010, 27:47-52.
 18. Shimada E, Aida K, Sugawara T, Hirata T: Inhibitory effect of topical maize glucosylceramide on skin photoaging in UVA-irradiated hairless mice. *Journal of oleo*

science 2011, **60**:321-325.

19. Duan J, Sugawara T, Hirose M, Aida K, Sakai S, Fujii A, Hirata T: **Dietary sphingolipids improve skin barrier functions via the upregulation of ceramide synthases in the epidermis.** *Experimental dermatology* 2012, **21**:448-452.

利益相反

本研究の一部は興人ライフサイエンス株式会社の支援にて行った。

謝辞

本論文は筆者が平成 23 年度より京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻博士前期課程および京都府立大学生命環境学部食保健学科研究生在籍中の成果をまとめたものである。同専攻准教授の和田小依里先生には指導教員として研究実施の機会を与えていただき、その遂行にあたり、ご指導いただき厚く御礼申し上げます。また、同じ研究室の同専攻教授の東あかね先生ならびに同専攻准教授の青井渉先生にもご指導いただき深く御礼申し上げます。同専攻教授の南山幸子先生、ならびに、同専攻教授の松井元子先生には副査としてご助言をいただくとともに本論文の細部にわたりご指導をいただきました。深く感謝いたします。同専攻健康科学研究室の皆様には、研究や論文執筆にあたり大変お世話になりました。感謝致します。

本研究の実験では、興人ライフサイエンス株式会社より試料を提供していただきました。担当の佐藤寿哉様をはじめとする同社関係者の皆様に御礼申し上げます。

また、自身の将来の選択肢として大学院への進学を勧めてください、研究者としての一歩を後押ししてくださった元相模女子大学食物学科准教授の清田マキ先生に厚く御礼申し上げます。大学院終了後、大学教育に携わる者として研究者として、ご指導ご支援いただきました武庫川女子大学食物栄養学科教授の升井洋至先生をはじめとする同学科の先生方、および長野県立大学健康発達学部学部長の笠原賀子先生をはじめとする同学部食健康学科の先生方に深く感謝致します。

公表論文

第 2 章 トルラ酵母グルコシルセラミド経口摂取のヒトの皮膚に与える影響

公表論文：Fukunaga S, Wada S, Sato T, Hamaguchi M, Aoi W, Higashi A.

Effect of torula yeast (*Candida utilis*)-derived glucosylceramide on skin dryness and other skin conditions in the winter. *Journal of Nutrition Science and Vitamiology* 64: 265-270 (2018)

第 3 章 トルラ酵母抽出物およびトルラ酵母グルコシルセラミドのメラニン生成抑制, および植物抽出物との比較

公表論文：Fukunaga S, Wada S, Aoi W, Osada-Oka M, Minamiyama Y, Ichikawa H, Higashi A.

Effect of melanogenesis inhibition by a yeast extract in comparison to that by other food extracts, and its mechanism of action. *Journal of Food Biochemistry* 42: e12520 (2018)

第 4 章 ヒト線維芽細胞におけるトルラ酵母抽出物の線維芽細胞増殖, コラーゲン産生増加, コラーゲングル収縮作用におよぼす影響

公表論文：Fukunaga S, Wada S, Yamashita M, Morita M, Aoi W, Naito Y, Higashi A.

Torula yeast (*Candida utilis*)-derived glucosylceramide contributes to dermal elasticity in vitro. *Journal of Food Biochemistry* 43: e12847 (2019)

